



**UNIVERSIDAD MICHOACANANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR DE PLANTAS

**Análisis de la actividad de las proteínas TOR y SnRK1 en
Arabidopsis thaliana inducida por los factores de
virulencia piocianina y ramnolípidos producidos por
*Pseudomonas aeruginosa***

TESIS

que presenta

BIOL. Daniela García García

para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Experimental

Director: D.C. Homero Reyes de la Cruz

Morelia, Michoacán, agosto de 2023

Índice

Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. Introducción	3
1.1 Respuesta al estrés en plantas	3
1.1.1 Adaptación flexible del sistema radicular en respuesta al estrés	3
1.2 Especies reactivas de oxígeno (ERO).....	4
1.3 Inmunidad vegetal	5
1.4 Reguladores metabólicos TOR y SnRK1	7
1.4.1 El complejo TOR en plantas.....	8
1.4.2 El complejo SnRK1 en plantas.....	9
1.5 Mecanismo de activación de las proteínas cinasas TOR y SnRK1 en plantas	10
1.6 Red de señalización entre los reguladores metabólicos SnRK1 y TOR en plantas.....	13
1.7 Proceso de autofagia e interacción de proteínas ATG en plantas.....	14
1.8 Relación entre el estrés oxidativo y la activación de la autofagia en plantas	15
1.9 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
1.9.1 Factores de virulencia producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
1.9.1.1 Factores de patogenicidad asociados a la célula bacteriana	16
1.9.1.1.1 Adhesinas	16
1.9.1.1.2 Adhesinas no-pilus	16
1.9.1.1.3 Alginato	17
1.9.1.1.4 Formación de biopelícula	17
1.9.1.1.5 Lipopolisacárido	18
1.9.1.1.6 Flagelo	18
1.9.1.1.7 Pilus tipo IV	18
1.9.1.2 Factores de patogenicidad secretados por la célula bacteriana	19
1.9.1.2.1 Sistema de secreción de proteínas	19
1.9.1.2.1.2 Sistema de secreción tipo I (T1SS)	19
1.9.1.2.1.3 Sistema de secreción tipo II (T2SS).....	19

1.9.1.2.1.4	Sistema de secreción tipo III (T3SS)	20
1.9.1.2.1.5	Sistema de secreción tipo V (T5SS)	21
1.9.1.2.1.6	Sistema de secreción tipo VI (T6SS)	21
1.9.1.2.2	Sideróforos: Pioverdina y Pioquelina	22
1.9.1.2.3	Piocianina	22
1.9.1.2.4	Ramrólpidos	22
1.9.2	Sistema de “ <i>Quorum sensing</i> ” en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
1.9.3	Sistemas QS de acil-homoserina lactona: Las y Rhl	24
1.9.4	El Sistema Quinolona QS: Pqs e lqs	24
2.	Antecedentes	25
2.1	Efectos del factor de virulencia piocianina (PYO) en plantas	26
2.2	Efecto de los ramrólpidos (RL) en plantas	26
2.3	Modulación de las compensaciones entre crecimiento y defensa en respuesta al ataque por patógenos a través de las proteínas cinasas TOR y SnRK1	26
2.4	La señalización de TOR atenúa la acción de las hormonas inmunitarias ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA)	28
3.	Justificación	29
4.	Hipótesis	29
5.	Objetivos	29
5.1	General	29
5.2	Particulares	29
6.	Materiales y métodos	30
6.1	Condiciones de crecimiento de las plantas	30
6.2	Preparación de los medios suplementados con los factores de virulencia	31
6.3	Preparación de los medios suplementados con los inhibidores	31
6.4	Evaluación del crecimiento y desarrollo de las plántulas	31
6.5	Extracción de proteínas citoplasmáticas	31
6.6	Electroforesis	32
6.7	Transferencia de las proteínas	32
6.8	Inmunodetección de las proteínas	33
6.1	Revelado y análisis densitométrico de las proteínas	33

6.2	Detección de especies reactivas de oxígeno.....	34
6.2.1	Determinación de anión superóxido (O ₂ ⁻) con nitroazul de tetrazolio (NBT) 34	
6.2.2	Determinación de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) con diaminobencidina (DAB) 34	
6.3	Microscopía y tinción de cuerpos autofágicos.....	34
6.1	Análisis estadístico	35
7.	Resultados.....	35
7.1	Efecto de la piocianina sobre el crecimiento y desarrollo de la raíz en plántulas Col-0, <i>kin10</i> y <i>raptor1b</i> en <i>A. thaliana</i>	35
7.2	Efecto de los ramnolípidos sobre el crecimiento y desarrollo de la raíz en plántulas Col-0, <i>kin10</i> y <i>raptor1b</i> en <i>A. thaliana</i>	36
7.3	Efecto de la combinación piocianina + ramnolípidos sobre el crecimiento y desarrollo de raíz en plántulas Col-0, <i>kin10</i> y <i>raptor1b</i> en <i>A. thaliana</i>	38
7.4	Efecto de la exposición a la piocianina y a los ramnolípidos de <i>P. aeruginosa</i> , sobre los niveles de fosforilación de la cinasa de la proteína ribosómica S6 en plántulas Col-0, <i>kin10</i> y <i>raptor1b</i> en <i>A. thaliana</i>	39
7.5	Efecto de la exposición a la piocianina y a los ramnolípidos, a 6, 8, 10 y 12 horas, sobre los niveles de fosforilación de la cinasa de la proteína ribosómica S6 (S6K) en plántulas Col-0 en <i>A. thaliana</i>	40
7.6	Efecto de la piocianina y ramnolípidos, a 8 horas de exposición, sobre los niveles de fosforilación de la cinasa de la proteína ribosómica S6 (S6K) en plántulas Col-0, <i>kin10</i> y <i>raptor1b</i> en <i>A. thaliana</i>	41
7.7	La piocianina incrementa los niveles de acumulación de anión superóxido (O ₂ ⁻) en las puntas de las raíces de plántulas Col-0, <i>kin10</i> y <i>raptor1b</i> en <i>A. thaliana</i>	42
7.8	La piocianina induce la activación de la autofagia en las puntas de las raíces de plántulas Col-0, <i>kin10</i> y <i>raptor1b</i> en <i>A. thaliana</i>	45
7.9	Efecto de la inhibición de la proteína SnRK1 ante la exposición a la piocianina sobre los niveles de fosforilación de la cinasa de la proteína ribosómica S6 en plántulas Col-0, <i>kin10</i> y <i>raptor1b</i> en <i>A. thaliana</i>	47
7.10	La activación de la proteína SnRK1 juega un papel importante durante la tolerancia al estrés por ERO ante la exposición a la piocianina en plántulas Col-0, <i>kin10</i> y <i>raptor1b</i> en <i>A. thaliana</i>	48
8.	Discusión y conclusiones	50
9.	Literatura citada.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formación de diferentes especies reactivas de oxígeno a partir del oxígeno atmosférico en plantas..	5
Figura 2. Representación esquemática de la respuesta inmune de las plantas contra patógenos en un modelo “zigzag”.	7
Figura 3. Resumen simplificado de la red de señalización de las proteínas TOR y SnRK1 en plantas.	13
Figura 4. Ilustración esquemática de la interconexión de los sistemas QS en <i>P. aeruginosa</i> .	25
Figura 5. Efecto de la piocianina sobre el crecimiento y desarrollo de la raíz en plántulas Col-0, <i>kin10</i> y <i>raptor1b</i> en <i>A. thaliana</i> .	36
Figura 6. Efecto de los ramnolípidos sobre el crecimiento y desarrollo de la raíz en plántulas Col-0, <i>kin10</i> y <i>raptor1b</i> en <i>A. thaliana</i> .	37
Figura 7. Efecto de la combinación de piocianina+ ramnolípidos sobre el crecimiento y desarrollo de la raíz en plántulas Col-0, <i>kin10</i> y <i>raptor1b</i> en <i>A. thaliana</i> .	38
Figura 8. Efecto de la exposición a la piocianina y los ramnolípidos de <i>P. aeruginosa</i> , sobre los niveles de fosforilación de la cinasa de la proteína ribosómica S6 en plántulas Col-0, <i>kin10</i> y <i>raptor1b</i> en <i>A. thaliana</i> .	39
Figura 9. Efecto de la exposición a la piocianina y los ramnolípidos, a 6, 8, 10 y 12 horas, sobre los niveles de fosforilación de la cinasa de la proteína ribosómica S6 (S6K) en plántulas Col-0 en <i>A. thaliana</i> .	40
Figura 10. Efecto de la piocianina y ramnolípidos, a 8 horas de exposición, sobre los niveles de fosforilación de la cinasa de la proteína ribosómica S6 (S6K) en plántulas Col-0, <i>kin10</i> y <i>raptor1b</i> en <i>A. thaliana</i> .	41
Figura 11. Acumulación de O ₂ ⁻ en las puntas de raíces de Col-0, <i>kin10</i> y <i>raptor1b</i> frente a la exposición con PYO.	43

Figura 12. Acumulación de H ₂ O ₂ en las puntas de raíces de Col-0, <i>kin10</i> y <i>raptor1b</i> frente a la exposición con PYO.....	44
Figura 13. La piocianina induce la formación de cuerpos autofágicos en las líneas Col-0, <i>kin10</i> y <i>raptor1b</i>	46
Figura 14. Efecto de la inhibición de la proteína SnRK1 ante la exposición a la piocianina sobre los niveles de fosforilación de la cinasa de la proteína ribosómica S6 en plántulas Col-0, <i>kin10</i> y <i>raptor1b</i> en <i>A. thaliana</i>	48
Figura 15. Evaluación del crecimiento y desarrollo ante la inhibición de la proteína SnRK1 durante la tolerancia al estrés por ERO en plántulas Col-0, <i>kin10</i> y <i>raptor1b</i> en <i>A. thaliana</i> ..	49
Figura 16. Modelo propuesto de la participación de la proteína SnRK1 durante la tolerancia al estrés por ERO ante la exposición a la piocianina en <i>A. thaliana</i>	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos y concentraciones de los reactivos.....	30
---	----

Abreviaturas

5'TOP: tracto de oligopirimidina terminal 5'

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADP: adenosín difosfato

ADPRT: ribosil transferasa ADP (por sus siglas en ingles)

AI: autoinductores

AMPK: AMP Activated Kinase

APR: proteasas alcalinas (por sus siglas en ingles)

APX: ascorbato peroxidasa

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

AT: autotransportadores

ATG: proteínas relacionadas con la autofagia (por sus siglas en ingles)

ATP: Adenosín trifosfato

Bzip: basic leucine zipper proteins

cAMP: Adenosín monofosfato cíclico

CAT: catalasa

CBL: proteínas tipo calcineurina B (por sus siglas en ingles)

cCMP: citosín monofosfato cíclico

Cdc42: homólogo de la proteína 42 de control de la división celular (por sus siglas en ingles)

CdiA: componente de los sistemas CDI

CdrA: adhesina extracelular

cGMP: guanosín monofosfato cíclico

cUMP: urasíl monofosfato cíclico

DAB: diaminobencidina

eDNA: ácido desoxirribonucleico extracelular (por sus siglas en ingles)

EF: factor de elongación (por sus siglas en ingles)

EPS: sustancias poliméricas extracelulares (por sus siglas en ingles)

ERO: especies reactivas de oxígeno

EstA: esterasa autotransportadora

ETI: inmunidad desencadenada por efectores (por sus siglas en ingles)

ETS: susceptibilidad desencadenada por efectores (por sus siglas en ingles)

Exo: exotoxinas

Flg22: flagelina

FlgE: proteína flagelar Hook

FlgK: proteínas asociadas a ganchos

Fli: proteína flagelina

GAP: proteína activadora de GTPasa
(por sus siglas en ingles)

GPX: glutatión peroxidasa

GR: glutatión reductasa

GST: glutatión-S-transferasa

HasP: proteína de unión a hemo

HR: respuesta hipersensible (por sus siglas en ingles)

JA: ácido jasmónico (por sus siglas en ingles)

LARP1: La-related protein 1

Las: elastasas

Lec: lectinas

LepA: proteasa extracelular grande
(por sus siglas en ingles)

LPS: lipopolisacáridos

LST8: lethal with sec13 protein 8

MAMP: patrones moleculares asociados a microbios (por sus siglas en ingles)

MAPK: proteínas cinasas activadas por mitógenos (por sus siglas en ingles)

MRF: factor regulador de la traducción que contiene el dominio MA3 (por sus siglas en ingles)

MS: Murashige y Skoog

MTI: inmunidad activada por MAMP
(por sus siglas en ingles)

MvFR: factor de virulencia múltiple (por sus siglas en ingles)

NB-LRR: receptores intracelulares del tipo de repetición rica en leucina de unión a nucleótidos (por sus siglas en ingles)

NBT: nitroazul de tetrazolio

NRPS: péptido sintetasas no ribosomales (por sus siglas en ingles)

Opr F: porina F

PaAP: aminopeptidasa de P. aeruginosa

PAAR: proteína 3 motivos prolina-alanina-alanina-arginina

PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos (por sus siglas en ingles)

PCD: muerte celular programada (por sus siglas en ingles)

PCH: pioquelina

PI3K: fosfatidilinositol-3-cinasa

Pil: pilina

Pld: Fosfolipasa

PlpD: proteína similar a patatina (por sus siglas en ingles)

PRR: receptores de reconocimiento de patrones (por sus siglas en ingles)

PTI: inmunidad activada por PAMP (por sus siglas en ingles)

PVD: pioverdina

PYO: piocianina

QS: Quorum sensing

Rac: proteínas de unión a GTP

RAPTOR: Regulatory- associated protein of TOR

RE: retículo endoplásmico

Rho: proteínas de unión a GTP

RICTOR: rapamycin-insensitive companion of mTOR

RL: ramnolípidos

RPS6: subunidad ribosomal 40S S6

S6K: cinasa de la proteína S6 ribosómica

SA: ácido salicílico (por sus siglas en ingles)

SAR: resistencia sistémica adquirida (por sus siglas en ingles)

Snf1: Sucrose non-fermenting 1

SnRK1: Sucrose non-fermenting-related kinase 1

SOD: superóxido dismutasa

Tap46: 2A phosphatase associated protein of 46 kD

TOR: Target of rapamycin

TORC: Target of rapamycin complex

TPS: autotransportadores y secreción de dos socios (por sus siglas en ingles)

TpsA: proteína pasajera secretada (por sus siglas en ingles)

TpsB: proteína translocadora (por sus siglas en ingles)

UFC: unidades formadoras de colonias

VgrG: proteína espiga para la translocación efectora (por sus siglas en ingles)

YAK1: Yet Another Kinase 1

ESTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR DE PLANTAS, DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS, DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA ASESORÍA DEL D.C. HOMERO REYES DE LA CRUZ.

EN LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO SE CONTÓ CON EL APOYO ECONÓMICO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA, No. DE BECARIO 797682, CVU 1145162.

Agradecimientos

A la **Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo** por abrirme las puertas y darme la oportunidad de formarme profesionalmente, por la calidez sus profesores y la ética y profesionalismo por los cuales se rigen.

A **CONACYT**, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca para la realización de este trabajo de investigación.

Al **D.C. Homero Reyes de la Cruz**, por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de formarme profesionalmente al lado de su equipo de trabajo, por su asesoría y el conocimiento transmitido, por la calidez humana y profesionalismo que lo caracteriza, pero sobre todo por el apoyo incondicional recibido tanto a mi persona como a este proyecto.

Al **D.C. Cesar Arturo Peña Uribe**, por su apoyo incondicional, las observaciones y sugerencias a este proyecto de investigación, gracias por resolver todas mis dudas y orientarme en todo momento, pero sobre todo le agradezco por la amistad y el trato tan cordial que tiene con todos en el laboratorio.

Al **D.C. Jesús Salvador López Bucio**, por las aportaciones a este proyecto de investigación, por las enseñanzas y su apoyo con el trabajo de laboratorio, gracias por su amistad y las risas compartidas.

A **mis sinodales, los D.C. Jesús Campos García, Ernesto García Pineda y Josué Altamirano Hernández**, por las aportaciones para mejorar este trabajo de investigación y por todo lo que me han enseñado durante estos 2 años, muchas gracias.

A **mis compañeros de laboratorio** Iván, Lolita, Hugo, Saul, Pepe, Omar, Kido, Mariana, Natalia y Uber, que los quiero mucho y les agradezco por todo el apoyo que me han brindado, han sido mi hogar durante estos 2 años, gracias por las risas y por los buenos momentos que han sido muchos, espero que la amistad tenemos dure para toda vida, muchas gracias.

Dedicatoria

A **Dios** por permitirme cumplir mis sueños, y por darme la maravillosa familia que tengo y que no cambiaría por nada del mundo.

A mis padres **Ma. Floripes Garcia Toledo** y **Ramón Garcia Gonzales** gracias por tanto amor que nos han dado a mis hermanos y a mí, por construir esta maravillosa familia que tenemos y por siempre guiarnos por el camino correcto, los adoro con toda mi alma.

A mis hermanos **Juan, Moy, Lupita y Ale** gracias por apoyarme en todo, por creer en mí, por la convivencia, por las risas los domingos, pero sobre todo por el amor incondicional que nos tenemos y que nos mantiene unidos ante las adversidades.

A mi hermano **José Ramón**, no hay ni un día que no te agradezca por apoyarme incondicionalmente en este sueño que comenzó hace 9 años, exactamente el tiempo que tenemos de no verte. Te extraño y te amo con toda mi alma, y quiero que sepas que todo lo que me has dado no ha sido en vano, no hubo ni un día que no diera todo de mí en la escuela para corresponderte con buenas notas y que te sintieras orgulloso de mí.

Y finalmente a mis sobrinos **Emmanuel, Moisito y Mariano** que los quiero y los adoro con todo mi corazón. Son la alegría de nuestro hogar, espero que algún día puedan leer este texto y sepan lo mucho que los queremos y que siempre tendrán un apoyo en sus tíos, que siempre vamos a velar por su bienestar y sus sueños.

Resumen

Las plantas al igual que otros organismos son capaces de adaptar su crecimiento y desarrollo en respuesta a distintos tipos de estrés, como el biótico inducido por *Pseudomonas aeruginosa* que es un patógeno oportunista en humanos y plantas, su capacidad para causar daño radica en la producción de factores de virulencia, dos de ellos son la piocianina y los ramnolípidos. En plantas, la percepción de señales de estrés es regulada a través de las proteínas cinasas TOR (Target of rapamycin) y SnRK1 (Sucrose non-fermenting-related kinase 1) las cuales actúan de manera antagónica ajustando el crecimiento y desarrollo en función de los recursos disponibles. TOR se activa en respuesta a suficiencia de nutrientes y actúa junto con las proteínas LST8 (lethal with sec13 protein 8) y RAPTOR (Regulatory-associated protein of mTOR) quien está codificada por dos genes *raptor1a* y *raptor1b* siendo este último el que se expresa en mayor cantidad. Por otro lado, SnRK1 está conformada por la subunidad catalítica (α) la cual es codificada por tres diferentes genes, siendo *kin10* el principal responsable de la actividad de la proteína. Además, cuenta con otras dos subunidades reguladoras (β , γ). Se realizaron experimentos con los factores de virulencia piocianina (PYO) y ramnolípidos (RL) a concentraciones de 4 $\mu\text{g/ml}$ y 40 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, sobre plántulas de *A. thaliana* Col-0 y líneas mutantes *kin10* y *raptor1b*. Se observó que los RL modulan el crecimiento y desarrollo de la raíz en *A. thaliana* a través de la de la proteína TOR, tal y como lo mostro la mutante *raptor1b* que mostro resistencia a la exposición por RL. La PYO induce la generación de especies reactivas en la planta lo cual estimula la actividad de la proteína SnRK1 quien a su vez regula a la baja la actividad de la proteína TOR, induciendo la activación de procesos catabólicos como la autofagia. Todos los resultados indican que la PYO producida por *P. aeruginosa* reprime el crecimiento de *A. thaliana*, regulando negativamente la actividad de la proteína TOR y activando a la proteína SnRK1.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, ramnolípidos, piocianina, TOR-SnRK1, autofagia

Abstract

Plants, like other organisms, are capable of adapting their growth and development in response to different types of stress, such as the biotic stress induced by *Pseudomonas aeruginosa*, which is an opportunistic pathogen in humans and plants. Its ability to cause damage lies in the production of virulence factors, two of them are pyocyanin and rhamnolipids. In plants, the perception of stress signals is regulated through the protein kinases TOR (Target of rapamycin) and SnRK1 (Sucrose non-fermenting-related kinase 1), which act in an antagonistic manner, adjusting growth and development based on the available resources. TOR is activated in response to nutrient sufficiency and acts in complex with proteins LST8 (lethal with sec13 protein 8) and RAPTOR (Regulatory-associated protein of mTOR). RAPTOR is encoded by two genes, *raptor1a* and *raptor1b*, being *raptor1b* mainly expressed. On the other hand, SnRK1 is made up of the catalytic subunit (α) which is encoded by three different genes, with *kin10* being the main responsible for the activity of the protein. In addition, it has two other regulatory subunits (β , γ). Experiments were performed on *A. thaliana* Col-0 seedlings and *kin10* and *raptor1b* mutant lines exposed to the virulence factors pyocyanin (PYO) and rhamnolipids (RL). It was observed that the RL modulates the growth and development of the root in *A. thaliana* through the TOR protein, as shown by the *raptor1b* mutant that showed resistance to exposure to RL. PYO induces the generation of reactive species in the plant, which stimulates the activity of the SnRK1 protein, which in turn downregulates the activity of the TOR protein, inducing the activation of catabolic processes such as autophagy. All the results indicate that the PYO produced by *P. aeruginosa* represses the growth of *A. thaliana*, negatively regulating the activity of the TOR protein and activating the SnRK1 protein.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, rhamnolipids, pyocyanin , TOR-SnRK1, autophagy

1. Introducción

1.1 Respuesta al estrés en plantas

Las plantas al igual que otros organismos se enfrentan a diario a variaciones ambientales en su entorno, que van desde baja disponibilidad de nutrientes, cambios en la salinidad del suelo, sequías, temperaturas extremas, inundaciones (Deeksha *et al.*, 2020) e incluso se encuentran expuestas al ataque por diversos organismos como nematodos, hongos, virus y bacterias (Teixeira *et al.*, 2019; Paes de Melo *et al.*, 2022). Sin embargo, al ser organismos sésiles no pueden escapar de este tipo de ambientes desfavorables por lo cual han desarrollado mecanismos sofisticados y eficientes para percibir, evitar e incluso alcanzar la tolerancia a las condiciones ambientales limitantes (Imran *et al.*, 2021). Las plantas perciben diferentes señales a través de receptores primarios, que pueden estar incrustados en la superficie celular o localizados en el interior de esta (Kourelis y Van der Hoorn, 2018). La activación de estos sensores durante la respuesta tanto al estrés biótico como al estrés abiótico a menudo culmina en un flujo de iones a través de la membrana, normalmente en una entrada de calcio (Ca^{2+}) al citosol (Lamers *et al.*, 2020; Bhar *et al.*, 2022), seguido de una alta producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), que en primera instancia son utilizadas contra el ataque directo a patógenos, pero también actúan como segundos mensajeros promoviendo la expresión de genes involucrados en la respuesta al estrés (Hossain *et al.*, 2015; Paes de Melo *et al.*, 2022; Bhar *et al.*, 2022).

1.1.1 Adaptación flexible del sistema radicular en respuesta al estrés

La organogénesis de las plantas hace coincidir los recursos metabólicos disponibles con los programas de desarrollo. El sistema radicular es un órgano muy flexible en cuestiones de adaptabilidad, está determinado por la raíz principal o raíz primaria (RP) a partir de la cual emergen una serie de raíces secundarias o raíces laterales (RL), mientras que las raíces adventicias (RA) se forman a partir de órganos no radiculares (Stitz *et al.*, 2023). Estas últimas se originan a partir de tallos o tejidos foliares y están presentes en varias especies de plantas donde normalmente brindan soporte o suministro de aire, sin embargo, en algunas otras especies de plantas son inducidas por estreses ambientales y fisiológicos para expandir las

áreas de absorción o mejorar la resistencia a la adversidad (Deng *et al.*, 2017), por ejemplo, ante la inhibición o la eliminación de la raíz principal o en hipocótilos etiolados (Verstraeten *et al.*, 2014).

1.2 Especies reactivas de oxígeno (ERO)

En las plantas, al igual que otros organismos aerobios las ERO se producen continuamente como subproductos de varias rutas metabólicas localizadas en diferentes compartimentos celulares, como las mitocondrias, cloroplastos, peroxisomas y apoplastos (Xie *et al.*, 2019). En las plantas, las principales formas de ERO son el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^{\cdot}), las cuales se forman a partir del oxígeno atmosférico (figura 1) (Mittler, 2017; Waszczak *et al.*, 2017). Estas moléculas actúan como moléculas señal y regulan la progresión de diferentes procesos biológicos básicos relacionados con la diferenciación celular, la proliferación y la muerte celular (Hasanuzzaman *et al.*, 2020). En contraste con las demás ERO, el H_2O_2 es una molécula más estable y puede difundir en las células, por esta particularidad, juega un papel importante como molécula señal (Dangl y Jones, 2001; Choudhary *et al.*, 2020). Por ejemplo, durante la defensa contra patógenos, las células vegetales producen ERO a través de la actividad enzimática de enzimas como la NADPH-oxidasas unidas a la membrana plasmática, las peroxidasas unidas a la pared celular y las amina oxidasas en el apoplasto. El estallido oxidativo que se produce actúa a nivel local y sistémico activando la transcripción de genes involucrados en la defensa de la planta, así como la muerte celular programada (PCD) (Apel y Hirt, 2004). Algo muy similar ocurre durante el estrés abiótico, ambas vías comparten características comunes, particularmente relacionadas con la producción de ERO por NADPH oxidasas. En principio se desencadenan señales locales y sistémicas donde esta involucra la señalización con ERO para la activación de respuestas de defensa genéricas primarias que aumentan la resistencia a amenazas posteriores (Noctor *et al.*, 2018).

En condiciones fisiológicas, estas moléculas son eliminadas por el sistema de defensa antioxidante de la planta el cual está conformado por componentes

enzimáticos y no enzimáticos que se encargan de la detoxificación del exceso de ERO. El sistema enzimático incluye principalmente a la enzima superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR), y glutatión-S-transferasa (GST). Mientras que el sistema no enzimático incluye antioxidantes de bajo peso molecular, como el glutatión, ácido ascórbico, tocoferol, flavonoides, carotenoides y alcaloides (Apel y Hirt, 2004; Choudhary *et al.*, 2020). El equilibrio entre la producción y la eliminación de ERO puede verse perturbado por una serie de factores ambientales adversos. Cuando la cantidad de ERO supera la capacidad del sistema antioxidante para neutralizar o eliminarlas se dice que hay un estrés oxidativo (Mittler, 2017). Como resultado de estas alteraciones, los niveles intracelulares de ERO pueden aumentar rápidamente dificultando la función celular normal, dañando orgánulos y biomoléculas como carbohidratos, lípidos, proteínas, ADN, y finalmente provocar la muerte celular (Foyer y Noctor, 2005).

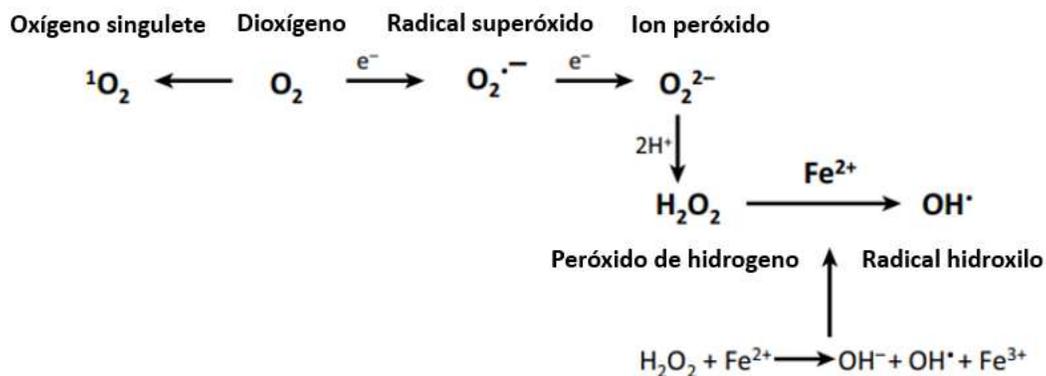


Figura 1. Formación de diferentes especies reactivas de oxígeno a partir del oxígeno atmosférico en plantas. El oxígeno atmosférico (O_2) sufre reducción para formar oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), respectivamente. El superóxido se dismuta para formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y este a su vez puede interactuar con Fe^{2+} originando así radicales hidroxilo (HO^{\cdot}) a través de la reacción de Fenton. Modificado de Mittler, 2017.

1.3 Inmunidad vegetal

La primera línea de defensa de las plantas la constituyen las barreras físicas como cutículas cerosas, paredes celulares rígidas y metabolitos secundarios antimicrobianos. Los patógenos que logran superar con éxito estas barreras se enfrentan con el sistema inmunológico de la planta, el cual se encarga de detener la progresión de la colonización microbiana (Nishad *et al.*, 2020).

El “modelo en zig-zag” clásico es el primer modelo propuesto del sistema inmunitario de las plantas que describe las estrategias moleculares entre hospedantes y patógenos (figura 2) (Jones y Dangl, 2006). Cada patógeno tiene una molécula distintiva que ayuda a los huéspedes a identificar la amplia categoría de patógenos, denominada patrones moleculares asociados a microbios (MAMP) o patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Ejemplos de estos patrones moleculares son la flagelina bacteriana (flg22), el factor de elongación (EF), la quitina fúngica y los lipopolisacáridos (LPS) (Nishad *et al.*, 2020; Bhar *et al.*, 2022). La planta huésped posee receptores afines para estos MAMP/PAMP, denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Cuando ocurre la interacción entre estos componentes se desencadena la inmunidad activada por PAMP (PTI) (o inmunidad activada por MAMP (MTI)). La respuesta PTI en las plantas se caracteriza por la afluencia del Ca^{2+} en las células, generación de ERO, cascadas de fosforilación de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), alteraciones de la pared celular, y finalmente expresiones de genes de defensa (Windram y Denby, 2015; Bigeard *et al.*, 2015; de Lorenzo *et al.*, 2018; Saijo *et al.*, 2018). Esta primera fase regularmente restringe la colonización del patógeno (Jones y Dangl, 2006; Sanzón y Zavaleta, 2011). Sin embargo, los patógenos exitosos que sobreviven a esta restricción, producen efectores específicos que contribuyen a la virulencia y que pueden interferir con la PTI, entonces se genera una susceptibilidad desencadenada por efectores (ETS) lo que constituye la segunda fase. Los efectores a menudo son toxinas que pueden ser específicos o no para el huésped. Para protegerse de los efectos nocivos de las toxinas, muchas plantas poseen proteínas “R” (proteína de resistencia). La mayoría de estas proteínas R son receptores intracelulares del tipo de repetición rica en leucina de unión a nucleótidos (NB-LRR) que reconocen específicamente el efector dado y activan la segunda ola de señalización de defensa llamada inmunidad desencadenada por efectores (ETI). La ETI es una respuesta de resistencia más robusta que la PTI y específica frente a patógenos, desencadena la respuesta hipersensible (HR) y resistencia sistémica adquirida (SAR) en el huésped, lo cual caracteriza la tercera fase. Como resultado de la presión de selección, los patógenos perdieron o alteraron el efector que se

reconoce o ganaron nuevos efectores para suprimir la respuesta de ETI. De la misma manera evolucionaron nuevos receptores en las plantas capaces de reconocer los efectores obvios o los efectores recién adquiridos, lo que nuevamente resultó en ETI (cuarta fase) (Jones y Dangl, 2006; Thomma *et al.*, 2011).

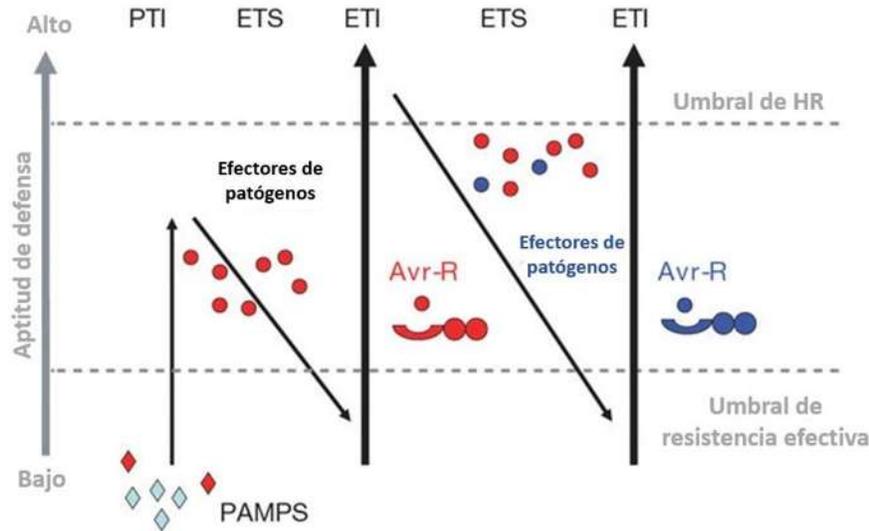


Figura 2. Representación esquemática de la respuesta inmune de las plantas contra patógenos en un modelo “zigzag”. En la fase 1, las plantas detectan patrones moleculares microbianos/asociados a patógenos (MAMP/PAMP, diamantes) a través de PRR para activar la inmunidad activada por PAMP (PTI). En la fase 2, los patógenos exitosos liberan efectores que interfieren con la PTI o permiten la dispersión del patógeno, lo que da como resultado una susceptibilidad desencadenada por efectores (ETS). En la fase 3, un efector (indicado en rojo) es reconocido por una proteína NB-LRR, activando la inmunidad activada por efector (ETI), una versión amplificada de PTI que a menudo pasa un umbral para la inducción de muerte celular hipersensible (HR). En la fase 4 se seleccionan aislados de patógenos que han perdido el efector, y probablemente surgieron nuevos efectores a través del flujo de genes horizontal (en azul); estos pueden ayudar a los patógenos a suprimir la ETI. La selección favorece los nuevos alelos NB-LRR de la planta que pueden reconocer uno de los efectores recién adquiridos, dando como resultado nuevamente ETI. Jones y Dangl, 2006

1.4 Reguladores metabólicos TOR y SnRK1

Para lidiar con condiciones de crecimiento desfavorables, las plantas cuentan sistemas complejos de transducción de señales muy eficientes, capaces de percibir el estrés y de ajustar el crecimiento y desarrollo en función de los recursos disponibles (Fu *et al.*, 2020). En plantas, como todos los organismos eucariotas, existe una intrincada red de señalización, en la que dos proteínas cinasas; TOR (Target of rapamycin) y SnRK1 (Sucrose non-fermenting-related kinase 1), cuyos ortólogos en levaduras y mamíferos son AMPK (AMP Activated Kinase) y Snf1

(Sucrose non-fermenting 1), respectivamente, actúan de manera antagónica ejerciendo su función a través de una amplia reprogramación transcripcional y metabólica, con la finalidad de ajustar el crecimiento y desarrollo (Robaglia *et al.*, 2012; Baena-González y Hanson, 2017; Wu *et al.*, 2019; Rodríguez *et al.*, 2019).

1.4.1 El complejo TOR en plantas

La proteína cinasa TOR es una atípica Ser/Thr cinasa estrechamente relacionada con la familia de proteínas cinasas relacionadas con la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) (Xiong and Sheen, 2014; Robaglia *et al.*, 2012; Dobrenel *et al.*, 2016). En mamíferos y levaduras la proteína TOR forma dos complejos proteicos estructural y funcionalmente distintos en TORC1 y TORC2 (Target of rapamycin complex). Ambos complejos tienen una subunidad en común, LST8 (lethal with sec13 protein 8) pero la diferencia está en su otro componente, que en el caso del TORC1 es la proteína RAPTOR (Regulatory- associated protein of TOR), mientras que en el TORC2 el otro componente es la proteína RICTOR (rapamycin-insensitive companion of mTOR) (Saxton y Sabatini, 2017; Tatebe y Shiozaki, 2017). En plantas existe TORC1 mientras que no se ha podido identificar ningún ortólogo para la proteína RICTOR en el genoma de las plantas (Xiong y Sheen, 2014; Dobrenel *et al.*, 2016; Van Leene *et al.*, 2019; Fu *et al.*, 2020).

En el TORC1 la proteína RAPTOR interactúa con el dominio N-terminal de la proteína TOR favoreciendo el reclutamiento de sus sustratos y la actividad catalítica del complejo (Aylett *et al.*, 2016). La proteína RAPTOR está codificada por dos genes *raptor1a* y *raptor1b*, de los cuales *raptor1b* es el que se expresa en mayor cantidad durante el desarrollo de la planta en comparación con *raptor1a*, cuya expresión es menor (Anderson *et al.*, 2005; Diaz-Troya *et al.*, 2008; Dobrenel *et al.*, 2016; Salem *et al.*, 2018). Aunque comparten cierta redundancia, la mutación en *raptor1b* da como resultado defectos significativos de crecimiento y desarrollo, mientras que los mutantes en *raptor1a* casi no muestran cambios en su morfología y desarrollo (Anderson *et al.*, 2005). Estos fenotipos observados en *raptor1b* respaldan las funciones fundamentales de la señalización de la proteína TOR para equilibrar el crecimiento y el desarrollo de las plantas a través de la modulación del

metabolismo celular (Salem *et al.*, 2018). Por otro lado, la proteína LST8 esta codificada por dos genes *LST8-1* y *LST8-2*, siendo *LST8-1* el gen que se expresa en mayor cantidad a lo largo del desarrollo de la planta en comparación con *LST8-2* (Moreau *et al.*, 2012). La proteína LST8 se une al dominio cinasa C-terminal de la proteína TOR junto a la hendidura del sitio activo de unión a ATP donde regula la selectividad y suministro del sustrato y, en consecuencia, la actividad de la proteína TOR (Moreau *et al.*, 2012; Aylett *et al.*, 2016). Las plantas mutantes *lst8-1* muestran un espectro de defectos de crecimiento en raíces y brotes acompañado de un retraso en la floración y senescencia similar a lo que se observa en los mutantes *raptor1b*, lo cual respalda la importancia de la señalización de la proteína TOR en el crecimiento y desarrollo (Anderson *et al.*, 2005; Moreau *et al.*, 2012; Kravchenko *et al.*, 2015; Salem *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2019).

1.4.2 El complejo SnRK1 en plantas

La proteína SnRK1 es complejo heterotrimérico Ser/Thr cinasa, compuesto por una subunidad catalítica α y dos subunidades reguladoras, β y γ . La subunidad catalítica α esta codificada por tres diferentes genes, *kin10*, *kin11* y *kin12* a los que también se les conoce como SnRK1 α 1, SnRK1 α 2 y SnRK1 α 3 respectivamente (Jossier *et al.*, 2009; Baena-González *et al.*, 2009). Sin embargo, solo se expresan *kin10* y *kin11* durante todo el desarrollo de planta, mientras que *kin12* se expresa en polen y semillas en niveles bajos (Baena-González *et al.*, 2007; Winter *et al.*, 2007; Fragoso *et al.*, 2009). De estos dos, *kin10* es el responsable de la mayor parte de la actividad de SnRK1 (Jossier *et al.*, 2009). Por un lado, se sabe que *kin10* y *kin11* pueden actuar en oposición entre sí en algunas situaciones. Por ejemplo, mientras que la sobreexpresión de *kin10* da como resultado una floración tardía, la sobreexpresión de *kin11* provoca una floración temprana (Williams *et al.*, 2014). Sin embargo, el mutante doble (*kin10/kin11*) es letal, en tanto que los mutantes individuales de *kin10* y *kin11* se asemejan a plantas de tipo silvestre, lo que sugiere que ambos poseen cierta redundancia en la función (Baena-González *et al.*, 2007). La subunidad reguladora β actúa como andamiaje y al igual que la subunidad catalítica α está codificada por tres genes en *Arabidopsis* (*SnRK1 β 1/ β 2/ β 3*) (Margalha *et al.*, 2019). Mientras que, la subunidad γ está codificada por un único

gen (*SnRK1βγ*) cuya función es regular la selectividad del sustrato (Kleinow *et al.*, 2000; Lumbreras *et al.*, 2001; Ramon *et al.*, 2013). Los mutantes en el único gen de la subunidad γ son inviables (Ramon *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2016) mientras que las mutaciones individuales de las subunidades α y β muestra un fenotipo en su mayoría de tipo silvestre en condiciones de crecimiento óptimas, lo que sugiere que existe una redundancia al menos parcial entre cada tipo de subunidad (Li *et al.*, 2009; Sheen, 2014; Jeong *et al.*, 2015; Mair *et al.*, 2015; Margalha *et al.*, 2019).

1.4.2.1 Familia de proteínas cinasas SnRK en plantas

En plantas a diferencia de otros organismos eucariotas existe un grupo de proteínas cinasas SnRK (SnRK1, SnRK2 y SnRK3) que desempeñan funciones vitales en una amplia gama de respuestas al estrés (Halford and Hey, 2009). La familia SnRK2 cuenta con 10 miembros (Kulik *et al.*, 2011), mientras que la familia de proteínas SnRK3 cuenta con 29 miembros en total, siendo este último el grupo más numeroso (Kolukisaoglu *et al.*, 2004; Jamsheer *et al.*, 2019). En general, las cinasas SnRK2 y SnRK3 son reguladas a través de la señalización de ácido abscísico (ABA) en respuesta a diversos tipos de estrés abiótico (Fu *et al.*, 2020; Zhao y Wang, 2020). Sin embargo, a diferencia de las cinasas SnRK1 y SnRK2, la cinasa SnRK3 se caracteriza por regular la respuesta al estrés de una manera dependiente de la señalización de calcio, ya que esta puede asociarse con proteínas tipo calcineurina B (CBL) (Lyzenga *et al.*, 2013; Steinhorst and Kudla 2013; Edel y Kudla 2015; Manik *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018; Jamsheer *et al.*, 2019). En tanto que las proteínas SnRK1 y SnRK2 actúan de manera opuesta en la red metabólica de las plantas regulando negativamente a la proteína TOR (Dobrenel *et al.*, 2016; Baena-González y Hanson 2017; Rosenberger y Chen 2018; Wang *et al.*, 2018; Rodríguez *et al.*, 2019; Van Leene *et al.*, 2019; Zhao y Wang, 2020).

1.5 Mecanismo de activación de las proteínas cinasas TOR y SnRK1 en plantas

Es actualmente aceptado que las cinasas TOR y SnRK1 interactúan estrechamente y actúan de manera opuesta en la regulación de los procesos modulados por

nutrientes en un modelo conocido como el modelo "yin-yang" (figura 3) (Robaglia *et al.*, 2012; Margalha *et al.*, 2019, Rodríguez *et al.*, 2019; Artins y Caldana, 2022)

La proteína SnRK1 se activa en respuesta a diversas situaciones de estrés, principalmente frente a la disminución de los niveles de energía al igual que ortólogos eucarióticos (AMPK y SNF1), para promover estrategias de removilización de nutrientes y ahorro de energía (Baena-Gonzalez *et al.*, 2007; Baena-González y Sheen, 2008; Tomé *et al.*, 2014). Sin embargo, a diferencia de AMPK, no se ha demostrado que la proteína SnRK1 esté regulado alostéricamente por AMP como sucede en mamíferos (Sugden *et al.*, 1999; Ghillebert *et al.*, 2011). Una característica común de las subunidades catalíticas de las proteínas AMPK, SNF1 y SnRK1 es su activación de varios cientos de veces por fosforilación de una treonina en el llamado "bucle de activación" (o bucle T) (Wurzinger *et al.*, 2017). La fosforilación y el reordenamiento conformacional del bucle de activación organiza el centro catalítico para la transferencia de fosforilo (Yan *et al.*, 2018). El compuesto C (6-[4-(2-Piperidin-1-iletoksi) fenil]-3-piri-idin-4 ilpirazolo[1,5-a]pirimidina), también conocido como dorsomorfina, se ha descrito recientemente como un inhibidor farmacológico de AMPK que bloquea eficazmente las acciones metabólicas de AMPK (Vucicevic *et al.*, 2011, Yang *et al.*, 2012), por lo que es probable que el uso de este fármaco también inhiba a sus ortólogos en plantas y levaduras.

La proteína SnRK1 induce la removilización de nutrientes a través de la fosforilación de una familia de factores de transcripción clave, como los bZIP (basic leucine zipper proteins), que regulan la expresión de genes involucrados en la degradación de la pared celular, el almidón, proteínas, lípidos, así como genes involucrados en activación de la autofagia y la gluconeogénesis (Baena- González *et al.*, 2007; Baena-González y Sheen, 2008; Mair *et al.*, 2015; Dröge-Laser y Weiste, 2018; Margalha *et al.*, 2019).

La proteína TOR se activa en respuesta a condiciones favorables energéticas como la luz, azúcares, auxinas, abundancia y disponibilidad de nutrientes (carbono, azufre, nitrógeno y fósforo) y de manera simultánea impulsa procesos anabólicos que consumen energía como la síntesis de proteínas y la división celular (figura 3)

(Shi *et al.*, 2018; Rodríguez *et al.*, 2019; Fu *et al.*, 2020; Ingargiola *et al.*, 2020; Zhao y Wan, 2020; McCready *et al.*, 2020; Liu y Xiong, 2022). Al igual que la proteína SnRK1, la proteína TOR logra esta regulación a través de la fosforilación de objetivos directos. El uso de mutantes inducibles por RNAi de *tor*, *lst8* o *raptor*, así como los inhibidores ATP competitivos de la proteína TOR como Torin y AZD8055, llevaron al descubrimiento de una conexión entre TOR y sus sustratos de fosforilación a una multitud de procesos de desarrollo (Stitz *et al.*, 2023). Uno de los objetivos de la proteína TOR, es el factor de transcripción E2F que es regulado positivamente para activar la transcripción de genes en fase S del ciclo celular implicados en la síntesis de ADN (Xiong *et al.*, 2013). Mientras que otros objetivos como YAK1 (Yet Another Kinase 1) que regula genes relacionados con el estrés y la defensa son regulados negativamente para permitir el crecimiento (Forzani *et al.*, 2019). La proteína TOR es ampliamente conocida por su participación en la regulación de la traducción ya que algunos de los sustratos que fosforila están implicados en este proceso como la proteína Tap46 (2A phosphatase associated protein of 46 kD) (Ahn *et al.*, 2011; Ahn *et al.*, 2015), la proteína LARP1 (La-related protein 1), la cual regula la traducción de ARN mensajeros (ARNm) con motivos 5'TOP (tracto de oligopirimidina terminal 5') que codifican proteínas ribosómicas (Tcherkezian *et al.*, 2014; Meyuhas y Kahan, 2015; Scarpin *et al.*, 2020) y la cinasa de la proteína S6 ribosómica (S6K) que transmite la señalización mediante la fosforilación de RPS6 (la subunidad ribosomal 40S S6) y MRF (factor regulador de la traducción que contiene el dominio MA3) (Fonseca *et al.*, 2014; Enganti *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2017; Schepetilnikov y Ryabova, 2018). Esta proteína es sustrato común para examinar la actividad de TOR (Xiong and Sheen, 2012; Xiong and Sheen, 2014). Existen dos isoformas S6K1 y S6K2 que la proteína TOR puede fosforilar en Thr449 y Thr455, respectivamente (Xiong and Sheen, 2012; Xiong *et al.*, 2013; Van Leene *et al.*, 2019).

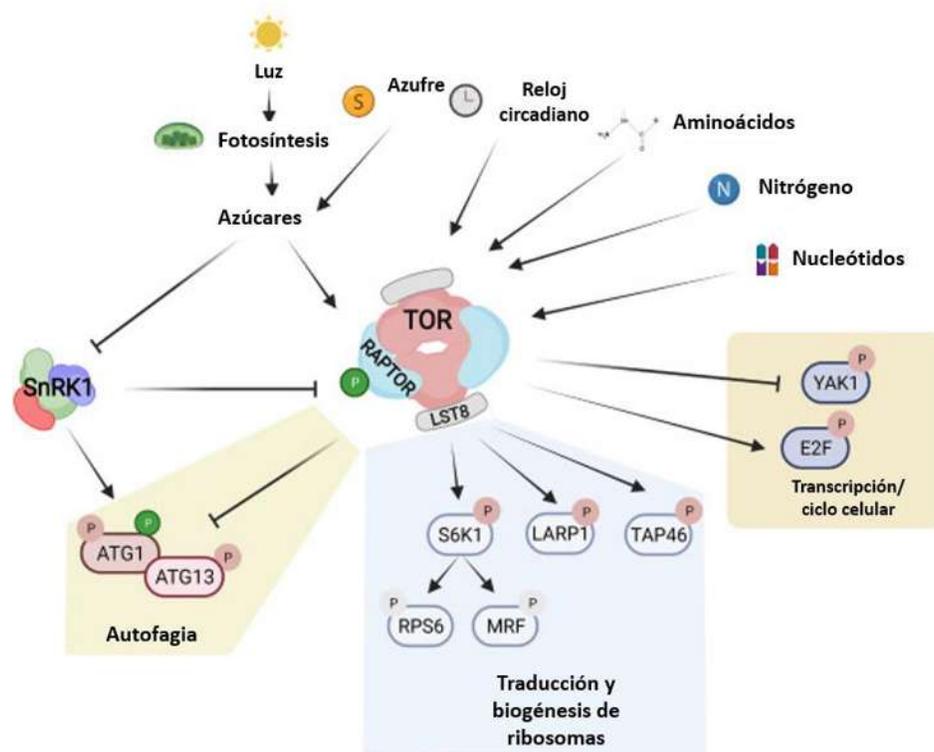


Figura 3. Resumen simplificado de la red de señalización de las proteínas TOR y SnRK1 en plantas. Las señales de luz, los azúcares derivados de la fotosíntesis y otros nutrientes activan la señalización de la proteína TOR y las salidas aguas abajo conservadas. TOR fosforila el factor de transcripción E2F y la cinasa YAK1 para modular el ciclo celular. Los procesos de traducción son regulados a través de la fosforilación la cinasa S6K1, LARP1 y TAP46. Mientras que los procesos catabólicos como la autofagia son reprimidos al fosforilar a la proteína ATG13 y provocar la disociación del complejo ATG1 y ATG13. La señalización de SnRK1 es activada por privación de nutrientes y diversos tipos de estrés, en estas situaciones la proteína SnRK1 reprime la señalización de la proteína TOR al fosforilar RAPTOR1B y promueve la activación de la autofagia a través de la fosforilación en ATG1. Artins y Caldana (2022).

1.6 Red de señalización entre los reguladores metabólicos SnRK1 y TOR en plantas

La proteína SnRK1 interactúa directamente con el complejo TORC1 en *Arabidopsis* a través de la subunidad catalítica KIN10 quien inhibe su actividad fosforilando a la proteína RAPTOR como en otros eucariotas (Gwinn *et al.*, 2008; Nukarinen *et al.*, 2016). Lo anterior desencadena la activación del catabolismo y la represión de los procesos anabólicos y del crecimiento que consumen energía. Las cinasas SnRK1 y TOR son los principales reguladores de la autofagia en respuesta a los niveles de nutrientes y energía (Soto-Burgos y Bassham, 2017; Mugume *et al.*, 2020). El complejo de proteínas relacionadas con la autofagia ATG1/ATG13 juega un papel esencial en el inicio de la autofagia (Yin *et al.*, 2016). En condiciones ricas en

nutrientes, la proteína TOR hiperfosforila a ATG13, lo que disminuye su afinidad por ATG1, quien es la subunidad catalítica del complejo, y en consecuencia se mantiene inactiva esta vía. Por otro lado, en condiciones de restricción de nutrientes, la proteína SnRK1 activa la autofagia mediante la fosforilación directa en ATG1 y a través de la inactivación de la proteína TOR que conduce a una rápida desfosforilación de ATG13, lo cual provoca una mayor afinidad de ATG13 por ATG1 y en consecuencia la activación de la autofagia (figura 3) (Mizushima, 2010; Suttangkakul *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2019).

1.7 Proceso de autofagia e interacción de proteínas ATG en plantas

La autofagia es un proceso catabólico altamente conservado en organismos eucariotas, durante el cual diversos componentes celulares como orgánulos dañados y/o proteínas mal plegadas son degradados en el interior de un compartimento lítico como lo es el lisosoma (en animales) o en el interior de la vacuola (en levaduras, hongos y plantas), para su descomposición y reciclamiento (Liu y Bassham, 2012; Minibayeva *et al.*, 2012; Parzych y Klionsky, 2014; Magen *et al.*, 2022). El proceso comienza con la formación de una vesícula de doble membrana llamada fagóforo, la cual comienza a encapsular los componentes celulares que van a ser degradados. El desarrollo del fagóforo requiere la coordinación de diferentes ATG, que están altamente conservadas entre plantas, levaduras y mamíferos (Hayward *et al.*, 2009; Soto-Burgos *et al.*, 2018). Algunas de estas proteínas ATG participan en la inducción del fagóforo (ATG1, ATG11 y ATG13), otras en transporte de lípidos para el agrandamiento de la membrana (ATG9, ATG2 y ATG18), nucleación de vesículas (ATG5 y ATG12) y expansión y cierre del fagóforo (ATG4, ATG8, ATG3 y ATG7). Después de recolectar los componentes citosólicos, el fagóforo se sella, formando un autofagosoma, que finalmente se fusiona con el compartimento lítico donde la carga es liberada para su degradación por hidrolasas vacuolares (Marshall y Vierstra, 2018).

Este proceso es esencial para mantener la homeostasis celular por lo que se produce en niveles basales en ausencia de estrés y en condiciones ricas en nutrientes (Magen *et al.*, 2022). Sin embargo, puede potenciarse durante diversas

situaciones de estrés como lo son la deficiencia de nutrientes, estrés por salinidad, sequía, altas temperaturas, hipoxia, estrés del retículo endoplásmico (RE), estrés oxidativo y ataque por patógenos (Wang *et al.*, 2017; Signorelli *et al.*, 2019).

1.8 Relación entre el estrés oxidativo y la activación de la autofagia en plantas

Cómo se mencionó anteriormente las ERO tienen un papel importante aguas arriba en la cascada de señalización de muchas respuestas tanto al estrés abiótico como al estrés biótico. Sin embargo, la sobreproducción de ERO daña organelos y biomoléculas, y dado que la autofagia puede promover la degradación de proteínas y orgánulos dañados durante el estrés oxidativo, se sugiere un vínculo entre las ERO y la autofagia, en el que las ERO inducen a la activación de la autofagia y esta puede reducir la producción de ERO como un sistema antioxidante no canónico a través de la eliminación de productos oxidados (Xiong *et al.*, 2007; Bassham, 2007; Minibayeva *et al.*, 2012; Signorelli *et al.*, 2019). De esta manera la autofagia promueve la supervivencia al degradar las proteínas y los orgánulos dañados durante el estrés oxidativo, pero también se activa como parte de los programas de muerte, cuando el daño no se puede superar (Bassham, 2007; Minibayeva *et al.*, 2012). Por lo tanto, la autofagia es fundamental para la tolerancia a una amplia gama de condiciones de estrés. Se ha demostrado que los mutantes de *Arabidopsis* en genes atg, con autofagia alterada, muestran una mayor susceptibilidad al estrés salino y estrés por sequía (Liu *et al.*, 2009) estrés oxidativo (Xiong *et al.*, 2007) y también al ataque por patógenos como virus, hongos y bacterias (Liu *et al.*, 2005; Patel y Dinesh-Kumar, 2008; Haxim *et al.*, 2017; Hafren *et al.*, 2017; Hofius *et al.*, 2017; Hafren *et al.*, 2018). Ejemplo de este tipo de estrés biótico, se ha descrito que tras la infección en plántulas de *Arabidopsis* por organismos patógenos como el hongo *Botrytis cinerea* y bacterias del género *Pseudomonas* se induce la activación de la autofagia, lo cual contribuye a la resistencia contra la enfermedad y es fundamental para equilibrar el crecimiento con la tolerancia al estrés (Hofius *et al.*, 2017).

1.9 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo gram negativo que mide entre 0,5-1 µm de diámetro y 1,5-5 µm de largo y cuenta con un flagelo polar que le confiere la motilidad necesaria para desplazarse con facilidad sobre cualquier superficie (Paz-Zarza *et al.*, 2019; Jurado-Martín *et al.*, 2021). *Pseudomonas aeruginosa* es considerada una bacteria altamente versátil, debido a la capacidad que tiene de adaptarse con gran facilidad y rapidez a cualquier tipo de ambiente ya que es capaz de utilizar diversos sustratos como fuente de nutrientes (Chrzanowski *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2015). Esta bacteria es considerada un patógeno oportunista tanto en humanos como en plantas y su capacidad para causar daño y colonizar diversos ambientes se debe en gran parte al arsenal de factores de virulencia que posee (Jurado-Martín *et al.*, 2021; Liao *et al.*, 2022; Veetilvalappil *et al.*, 2022).

1.9.1 Factores de virulencia producidos por *Pseudomonas aeruginosa*

Los factores de virulencia son moléculas que favorecen a los patógenos la invasión y la resistencia a las defensas del huésped, estos pueden estar asociados a la célula bacteriana o ser secretados por esta (De La Calle *et al.*, 2012).

1.9.1.1 Factores de patogenicidad asociados a la célula bacteriana

1.9.1.1.1 Adhesinas

Los factores de adherencia microbianos son polisacáridos o polipéptidos por naturaleza. Las adhesinas de naturaleza proteica se subclasifican además en fimbriales y afimbriales. Las adhesinas fimbriales están formadas por subunidades de proteínas largas y filiformes (Klemm *et al.*, 2010), mientras que las adhesinas afimbriales carecen de la estructura fimbrial, pero también ayudan a adherirse a los tejidos del huésped. Por otro lado, las adhesinas de polisacáridos forman parte de la membrana celular bacteriana, la pared celular o la cápsula. Las principales adhesinas presentes en *P. aeruginosa* son pili tipo IV, flagelo, adhesinas no pilus y la capsula de polisacárido (glicocáliz/alginato) (Veetilvalappil *et al.*, 2022).

1.9.1.1.2 Adhesinas no-pilus

Las adhesinas que no son pilus pueden unirse a las superficies bióticas y abióticas, desempeñan un papel importante en la unión a los tejidos del huésped y son

importantes para el mantenimiento de la estructura de la biopelícula (Veetilvalappil *et al.*, 2022). Dentro de este grupo están las lectinas: Lec A y Lec B, dos proteínas de unión a carbohidratos e importantes para la formación de biopelículas en superficies de poliestireno y acero inoxidable (Lec A) así como en superficies de vidrio (Lec B) (Fong y Yildiz, 2015). Otras proteínas importantes son, la porina F (Opr F) importante en la formación de biopelículas bajo condiciones anaerobias, la exoenzima S, proteasa alcalina, alginatos y lipopolisacáridos (LPS) (Hinsa y O'Toole, 2004).

1.9.1.1.3 Alginato

El alginato es un polímero de alto peso molecular con proporciones variables de ácidos D-manurónico y L-gulurónico que están enlazados en β 1-4 y parcialmente O-acetilados. Este exopolisacárido ayuda a la maduración, arquitectura y estabilidad de la biopelícula, aunque no es indispensable para la formación de esta (Ghafoor *et al.*, 2011). Además, la particularidad de los grupos acetilo contribuyen a su alta viscosidad, lo que permite la retención de agua y nutrientes (Mann *et al.*, 2012) y no solo eso, también protege a *P. aeruginosa* contra la fagocitosis del huésped en los pulmones (Leid *et al.*, 2005).

1.9.1.1.4 Formación de biopelícula

La capacidad de formar biopelículas es una de las características más importantes y distintivas en *P. aeruginosa* (Thi *et al.*, 2020; Jurado-Martin *et al.*, 2021). La biopelícula es una agregación específica de bacterias, embebidas en una serie de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), las cuales constituyen más del 50% del total de los componentes, entre estas están; el alginato y dos polisacáridos agregativos (Psl y Pel), pero también contiene ADN extracelular (eDNA) y proteínas (Mann y Wozniak, 2012). La formación de biopelícula es una de las estrategias clave para la supervivencia de las bacterias ya que les ayudan a eludir condiciones desfavorables como la fluctuación de temperatura, la deficiencia de nutrientes y la eliminación de productos de deshecho como los antibióticos (Rollet *et al.*, 2009; Yan y Wu, 2019; Thi *et al.*, 2020).

1.9.1.1.5 Lipopolisacárido

La membrana externa de *P. aeruginosa* limita la entrada de compuestos dañinos, con una cara interna de fosfolípidos y una cara externa de lipopolisacáridos, los cuales se encuentran embebidos en alrededor de 300 proteínas (Jurado-Martín *et al.*, 2021). Los lipopolisacáridos están compuestos por un lípido A, oligosacáridos del núcleo interno y externo, así como del antígeno O (Diggle y Whiteley 2022). Esta molécula constituye una barrera física y puede ser reconocido por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) del huésped e inducir la inflamación y la respuesta inmunitaria (Jurado-Martín *et al.*, 2021; Qin *et al.*, 2022). La interacción entre LPS y células eucariotas contribuye a la adherencia de *P. aeruginosa* al huésped y en conjunto con otras estructuras de la superficie bacteriana como flagelos y pili contribuyen a la adhesión/colonización bacteriana al huésped determinante en la virulencia de *P. aeruginosa* (Paz-Zarza *et al.*, 2019; Liao *et al.*, 2022).

1.9.1.1.6 Flagelo

El flagelo es un apéndice delgado, semejante a un pelo que sobresale de la célula bacteriana, dicha estructura permite la motilidad de natación en ambientes acuosos o de baja viscosidad y la quimiotaxis hacia sustratos específicos (Sampedro *et al.*, 2015; Liao *et al.*, 2022; Veetilvalappil *et al.*, 2022). Está constituido por flagelina polimerizada dispuesta helicoidalmente (FliC), una proteína de tipo capuchón (FliD), que cubre la parte final del filamento, el gancho en la base del filamento (FlgE) y dos proteínas de unión (FlgKL) que unen el gancho y el filamento, toda esta estructura se une a una serie de componentes (cuerpo basal) que se encuentra anclado entre las membranas interna y externa de la célula bacteriana (Haiko *et al.*, 2013; Jurado-Martín *et al.*, 2021). El flagelo contribuye a la adhesión bacteriana a través de la flagelina y la proteína de la tapa flagelar FliD (Sampedro *et al.*, 2015; Jurado-Martín *et al.*, 2021).

1.9.1.1.7 Pilus tipo IV

Los pili son estructuras filamentosas retractiles que controlan principalmente la motilidad espasmódica la cual se logra a través de la extensión y retracción de este

(Burrows, 2012), y en coordinación con el flagelo pueden generar otro tipo de movilidad, denominado “*swarming*” o motilidad enjambre (Jyot *et al.*, 2008). Estas estructuras son utilizadas por las bacterias para la rápida colonización de diferentes superficies, principalmente superficies semisólidas (Jurado-Martín *et al.*, 2022; Veetilvalappil *et al.*, 2022). Los pili están compuestos por miles de moléculas de una pequeña proteína monomérica, pilina mayor (PilA), junto con pilinas menores menos abundantes localizadas en la punta del pilus (FimU-PilVWXY1) las cuales se subdividen a la vez en pilinas menores centrales (importantes para la formación de pili y estabilización de la punta) y pilinas menores no centrales (involucradas en la agregación, la adhesión y la captación de ADN) (Jacobsen *et al.*, 2020; Jurado-Martín *et al.*, 2022). Debido a sus propiedades adhesivas y de motilidad, el pili también juega un papel importante en el desarrollo y agregación de biopelículas y debido a la particularidad que tiene la punta del pilus de unirse al ADN, probablemente esté involucrado en la transformación natural y la formación de biopelículas (Tolker-Nielsen, 2014; Van Schaik *et al.*, 2015).

1.9.1.2 Factores de patogenicidad secretados por la célula bacteriana

1.9.1.2.1 Sistema de secreción de proteínas

P. aeruginosa posee cinco sistemas secretores que producen una amplia variedad de toxinas y enzimas hidrolíticas para atacar al huésped y facilitar la invasión, penetración y propagación de la infección (Veetilvalappil *et al.*, 2022).

1.9.1.2.1.1 Sistema de secreción tipo I (T1SS)

Este sistema participa en la secreción de proteasas alcalinas Apr A y Apr X y una proteína de unión a hemo HasP, la cual ayuda a utilizar el hierro disponible para la supervivencia del patógeno (Van Schaik *et al.*, 2015; Jurado-Martín *et al.*, 2021).

1.9.1.2.1.2 Sistema de secreción tipo II (T2SS)

El sistema de secreción tipo II libera una amplia diversidad de exoproteínas como la aminopeptidasa de *P. aeruginosa* (PaAP), exotoxinas A, elastasas: Las A y Las B, proteasa IV y metaloproteasa (Bleves *et al.*, 2010). También se secretan a través de este sistema la fosfolipasa C y otras enzimas lipolíticas. Cuando la exotoxina A ingresa a la célula huésped provoca la detención de la biosíntesis de proteínas e

induce la muerte celular al inhibir el factor de elongación 2, por otro lado, las elastasas degradan proteínas estructurales como la elastina y el colágeno (Veetilvalappil *et al.*, 2022).

1.9.1.2.1.3 Sistema de secreción tipo III (T3SS)

Este sistema es "inyectosoma" similar a una nanoaguja macromolecular constituido por al menos 20 proteínas, esta estructura se compone por un aparato de secreción, el cual transporta los efectores a través de las membranas bacterianas y por el aparato de translocación, que transloca los efectores a través de la membrana de la célula huésped (Anantharajah *et al.*, 2016). El T3SS es considerado uno de los más importantes ya que es utilizado para inhabilitar y destruir el sistema inmunitario del huésped. Una vez que la bacteria se encuentra en la célula huésped este sistema se activa y comienza con la secreción de exotoxinas (ExoU, ExoT, ExoS y ExoY) (Anantharajah *et al.*, 2016; Khodayary *et al.*, 2019). La exoenzima U tiene una actividad de fosfolipasa A2 de manera que destruye irreversiblemente la membrana de la célula huésped, provocando una muerte celular rápida (Hauser, 2009). Por otro lado, la exotoxina T cuenta con actividades de proteína activadora de GTPasa (GAP) y adenosina difosfato ribosil transferasa (ADPRT), estas actúan en conjunto para impedir la fagocitosis y romper las barreras epiteliales principalmente a través de su acción sobre el citoesqueleto de actina. El dominio GAP es capaz de inactivar tres GTPasas pequeñas (Rac, Rho y Cdc42) que mantienen la organización del citoesqueleto de la célula huésped, lo que provoca una alteración reversible del citoesqueleto de actina de tal manera que se inhibe la migración celular y provoca el desprendimiento de las células (Hauser, 2009). De manera similar a la Exo T, la exotoxina S posee actividad bifuncional, su actividad GAP está dirigida hacia las mismas tres GTPasas que mantienen la organización del citoesqueleto, pero a diferencia de ExoT, el dominio ADPRT de ExoS se dirige a una amplia gama de factores y vías celulares, lo que provoca muerte celular, alteración del citoesqueleto de actina, inhibición de síntesis de ADN y del tráfico vesicular (Rocha *et al.*, 2003; Hauser *et al.*, 2009). La exoenzima Y es una adenilato ciclasa soluble que cuando se inyecta en las células eleva los niveles intracelulares de varios nucleótidos cíclicos (cAMP, cCMP, cGMP y cUMP) de manera que activa

algunas proteínas cinasas provocando el desmontaje irreversible de los microtúbulos de actina, la necrosis celular y la disfunción de los órganos diana (Wagener *et al.*, 2020).

1.9.1.2.1.4 Sistema de secreción tipo V (T5SS)

El T5SS también conocido como sistema auto transportador, es una maquinaria macromolecular que tiene dos subtipos: autotransportadores (AT) y secreción de dos socios (TPS) (Meuskens *et al.*, 2010). Los autotransportadores son, la proteína similar a patatina: PlpD, la cual funciona como una enzima lipolítica y la esterasa autotransportadora: EstA la cual es considerada un factor responsable de la motilidad de natación, espasmódica y enjambres en *P. aeruginosa* (Wilhelm *et al.*, 2019). Por otra parte, los sistemas de secreción de dos socios contienen dos proteínas, la proteína translocadora, TpsB, y la proteína pasajera secretada, TpsA (Meuskens *et al.*, 2019). Algunas de las proteínas secretadas por este sistema de dos socios son exolisina A, que provoca la lisis de la membrana plasmática, LepA que provoca respuestas inflamatorias y CdrA y CdiA que juegan un papel esencial en la formación de biopelículas (Bleves *et al.*, 2010).

1.9.1.2.1.5 Sistema de secreción tipo VI (T6SS)

El T6SS es la vía de secreción descrita más recientemente en *P. aeruginosa*, este sistema le permite administrar toxinas a sus patógenos vecinos y translocar efectores de proteínas a las células huésped (Chen *et al.*, 2015). Este sistema funciona como una jeringa molecular contráctil que consta de una vaina y un dispositivo de punción hecho de un tubo Hcp terminado por una espiga de proteínas VgrG y PAAR. Hay tres tipos de vías de secreción de tipo VI: H1-T6SS, H2-T6SS y H3-T6SS, donde H1-T6SS participa en la secreción de cinco efectores Tse1, Tse2, Tse13, VgrG1 y VgrG4 los cuales ayudan a inhibir el crecimiento de otras bacterias (Sana *et al.*, 2016). Por otro lado, los sistemas H2-T6SS y H3-T6SS secretan las enzimas fosfolipasas D, PldA y PldB, respectivamente, que también están involucradas en la a invasión de células huésped eucariotas (Chen *et al.*, 2015).

1.9.1.2.2 Sideróforos: Pioverdina y Pioquelina

Para cumplir con los requerimientos de hierro, *P. aeruginosa* cuenta con dos sideróforos para quelar el hierro unido a la transferrina, la lactoferrina, la ferritina y el hemo en el cuerpo del huésped (Veetilvalappil *et al.*, 2022). La pioquelina (PCH), un sideróforo basado en salicilato con una menor afinidad por el hierro y la pioverdina (PVD) que se compone de una cadena peptídica variable con un cromóforo de dihidroxiquinolina conservado que se une al hierro, es considerada el principal sideróforo (Dauner y Skerra, 2020). Dado que la producción de PVD es un proceso que demanda energía, *P. aeruginosa* produce principalmente pioquelina, y solo cuando la concentración de hierro es realmente baja, cambia a la producción de PVD (Cornelis y Dingemans, 2013).

1.9.1.2.3 Piocianina

La piocianina (PYO) es una fenazina, que puede atravesar fácilmente las membranas biológicas, por su naturaleza de zwitterión (Lau *et al.*, 2004; Rada y Leto *et al.*, 2013; Rashid *et al.*, 2020). Este metabolito secundario posee actividad redox responsable del color azul verdoso de las colonias de *P. aeruginosa* en cultivo (Gellatly y Hancock, 2013). Por esta característica, la PYO puede incrementar potencialmente los niveles intracelulares de ERO, particularmente anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) provocando estrés oxidativo y dañando los componentes del ciclo celular, varias enzimas y el ADN, lo que termina en lisis celular (Hall *et al.*, 2016). Esto finalmente termina en la liberación de eDNA, uno de los constituyentes cruciales en la formación de las biopelículas, por lo que se sugiere que la PYO, ayuda a la persistencia de las infecciones (Thi *et al.*, 2020; Zeng *et al.*, 2020). También juega un papel importante en la supervivencia de *P. aeruginosa* en condiciones de escasez de oxígeno, ya que puede aceptar y transportar electrones producidos en la respiración (Rada y Leto, 2013; Lau GW *et al.*, 2004).

1.9.1.2.4 Ramnolípidos

Los ramnolípidos (RL) son metabolitos secundarios extracelulares de naturaleza anfipática. Son glicolípidos formados por una molécula de L-ramnosa (mono-ramnolípidos) o dos (di-ramnolípidos) unidas a través de un enlace O-glucosídico a

una cadena de uno o dos ácidos β -hidroxicarboxílicos (Vilasó Cadre *et al.*, 2017; Schellenberger *et al.*, 2021). Estas moléculas actúan como biosurfactantes reduciendo la tensión superficial entre dos fases, de manera que facilitan la motilidad deslizante en ausencia de T4P y flagelos permitiendo la motilidad en enjambre (Tremblay *et al.*, 2007; Murray y Kazmierczak, 2008). Están involucrados en la liberación de LPS a la superficie celular, lo que aumenta la hidrofobicidad y la afinidad para la adherencia inicial de las bacterias a una superficie (Nickzad y Déziel, 2014). Además, esta propiedad surfactante le permite a la bacteria la absorción de sustratos hidrofóbicos (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010; Chrzanowski *et al.*, 2012). Y también tienen un papel importante en la formación de biopelículas. Una cantidad adecuada de RL contribuye a la arquitectura del biofilm al mantener abiertos los canales no colonizados (Davey *et al.*, 2003), mientras que una sobreproducción inhibe la formación de la biopelícula (Nickzad y Déziel, 2014).

1.9.2 Sistema de “*Quorum sensing*” en *Pseudomonas aeruginosa*

Algunos factores de virulencia son regulados a través del sistema de “*Quorum sensing*”, un mecanismo que permite la comunicación entre células y regula la transcripción de genes en respuesta a densidad celular (Lixa *et al.*, 2015; Jurado-Martín *et al.*, 2021). Este mecanismo permite la coordinación y adaptación de una población bacteriana mediada por pequeñas moléculas llamadas autoinductores (AI) que difunden a través de las membranas bacterianas y que se van acumulando progresivamente en el medio de crecimiento, por lo tanto, cuando la densidad celular es alta, el autoinductor alcanza una alta concentración intracelular y mediante interacción con activadores transcripcionales, promueven la expresión de un grupo de genes a nivel población para regular una gran variedad de respuestas fisiológicas (figura 4) (Paz-Zarza *et al.*, 2019; Jurado-Martín *et al.*, 2021).

P. aeruginosa tiene cuatro sistemas QS (Las, Rhl, Pqs e lqs) que están interconectados jerárquicamente: el sistema Las está en la parte superior de la jerarquía de señalización y controla positivamente la expresión de los otros tres sistemas (figura 4) (Lee *et al.*, 2015; Kostylev *et al.*, 2019). Los sistemas Las y Rhl son activados en la fase preliminar de crecimiento exponencial, mientras que los

sistemas Pqs e Iqs se activan en la última fase de crecimiento exponencial (Choi *et al.*, 2011).

1.9.3 Sistemas QS de acil-homoserina lactona: Las y Rhl

LasR y Rhl son los circuitos reguladores más dominantes. En el sistema Las, LasI es la sintasa autoinductora que media en la síntesis de N-3-oxododecanoil-L-homoserina lactona (3-O-C₁₂-HSL) (Kahlon, 2016; Kariminik *et al.*, 2017). A continuación, LasI se une al activador transcripcional (LasR), creando un complejo que regula específicamente la transcripción de genes de virulencia involucrados en daño de la célula huésped (LasA, LasB, AprA, PVD y ETA) (Jiménez *et al.*, 2012; Lee y Zhang, 2015; Kahlon, 2016) y a la par induce la expresión de los genes rhIR y rhII, así como los genes pqsR y pqsABCDH que codifican los sistemas Rhl y PQS respectivamente (Lee y Zhang, 2015) (figura 4). De manera similar, RhII sintetiza el autoinductor de este sistema, N-butilil-L-homoserina lactona (C₄-HSL), que forma un complejo con la proteína activadora (RhIR) (Kariminik *et al.*, 2017; Kostylev *et al.*, 2019). Este circuito regula la producción de RL, la producción de lectinas, PYO, AprA, cianuro de hidrogeno, PVD y PYC (Kahlon, 2016; Kariminik *et al.*, 2017; Thi *et al.*, 2020).

1.9.4 El Sistema Quinolona QS: Pqs e Iqs

En el sistema Pqs, el AI es la 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS) cuyo es precursor la 2-heptil-4(1H)-quinolona (HHQ), ambas son sintetizados por enzimas codificadas por el grupo de genes pqsABCDE y tanto PQS como HHQ son reconocidos por la proteína reguladora afín PqsR también conocido como regulador del factor de virulencia múltiple (MvfR) (Ahator y Zhang, 2014; Jurado-Martín *et al.*, 2021; Veetilvalappil *et al.*, 2022). Al unirse PqsR con el promotor de pqsABCDE, da como resultado la expresión de la proteína PqsE y a la vez retroalimenta para inducir la expresión del gen rhIRI (McKnight *et al.*, 2000; García-Reyes *et al.*, 2020) regulando así, la biosíntesis de ciertos factores de virulencia como PYO, RL, elastasa, cianuro de hidrógeno y lectinas (Ahator y Zhang, 2014; García-Reyes *et al.*, 2020; Liao *et al.*, 2022). Sin embargo, en determinado momento RhIR puede controlar la activación de la vía PQS al inhibir la expresión de los genes pqsR y pqsABCDH

(Cao *et al.*, 2001; Lee y Zhang, 2015). La identificación del sistema IQS es relativamente nueva en comparación con los otros sistemas QS. En el sistema Iqs el AI es el 2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldehído (IQS) sintetizado por el grupo de genes ambBCDE (Kahlon, 2016). Este sistema, al igual que los otros, está bajo el control del sistema Las. Sin embargo, se ha reportado que IQS también se activa por la limitación de fosfato, en tal condición, IQS asume parcialmente las funciones del sistema Las y, por lo tanto, controla el sistema Rhl y PQS (figura 4) (Lee *et al.*, 2013).

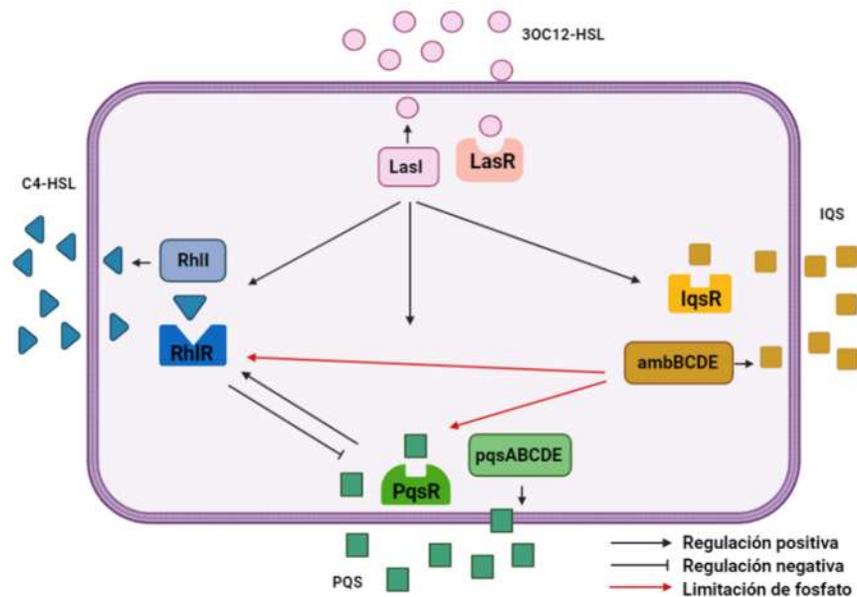


Figura 4. Ilustración esquemática de la interconexión de los sistemas QS en *P. aeruginosa*. Hay cuatro sistemas QS en *P. aeruginosa*, las, rhl, iqs y pqs. Incluyen las sintasas LasI, RhII, y los grupos de genes que codifican las sintasas AmbBCDE y PqsABCD, los autoinductores que sintetizan OdDHL, C4HSL, IQS y PQS respectivamente, así como los receptores de los autoinductores LasR, RhIR, IqsR y PqsR. Las flechas indican un efecto estimulante, mientras que la línea perpendicular indica un efecto inhibitorio. Modificado de: Lee y Zhang, 2015.

2. Antecedentes

Se ha observado recientemente que dos cepas de *P. aeruginosa* (PA01) mutantes en los genes NRPS (péptido sintetasas no ribosomales), particularmente en los genes *ambB/pvdI* y *PA4078/pvdL*, afectan negativamente el crecimiento y desarrollo en plántulas de *Arabidopsis thaliana* de forma más severa que la cepa PA01. Un análisis más detallado reveló que estas mutantes incrementan la producción de

piocianina y ramnolípidos (Solís-Ortiz *et al.*, 2022) dos factores de virulencia muy importantes para la patogenicidad de la bacteria.

2.1 Efectos del factor de virulencia piocianina (PYO) en plantas

La PYO por su bajo peso molecular y sus propiedades de zwitterion penetra fácilmente las membranas biológicas (Lau *et al.*, 2004; Rada y Leto, *et al.*, 2013; Rashid *et al.*, 2020). Este metabolito es un compuesto activo redox que tiene una serie de efectos potenciales. Existen muy pocos estudios sobre el efecto que tiene la PYO en plantas. Hasta el momento se ha informado que el tratamiento con PYO inhibe la división y elongación celular de la raíz primaria sin afectar la viabilidad del meristemo, lo cual se correlaciona con proporciones alteradas de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 que se detectaron en las puntas de las raíces (Ortiz-Castro *et al.*, 2016).

2.2 Efecto de los ramnolípidos (RL) en plantas

Los RL son esenciales para la diseminación de la superficie bacteriana llamada motilidad de enjambre y para el desarrollo normal de biopelículas (Davey *et al.*, 2003; Chrzanowski *et al.*, 2012). A medida que estos compuestos se liberan en el medio extracelular, tienen el potencial de ser percibidos por el sistema inmunológico de la planta (Schellenberger *et al.*, 2021). Se ha informado que los RL son potentes inductores de reacciones de defensa de las plantas, estas moléculas actúan como MAMP, desencadenan la producción de ERO y la entrada del flujo de Ca^{2+} a la célula culminando en la activación de las MAPK y la expresión de una amplia gama de genes de defensa (Varnier *et al.*, 2009; Schellenberger *et al.*, 2021), y se ha demostrado que esta respuesta inmune participa en la resistencia contra diversos patógenos en plantas (Varnier *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2012; Schellenberger *et al.*, 2021).

2.3 Modulación de las compensaciones entre crecimiento y defensa en respuesta al ataque por patógenos a través de las proteínas cinasas TOR y SnRK1

Diversos estudios han evaluado el papel de la proteína TOR frente al ataque por patógenos. De Vleeschauwer *et al.* (2018) inocularon plantas de arroz sobreexpresoras en TOR (*OX-TOR*) con la bacteria *Xanthomonas oryzae*, estas

plantas mostraron mayor susceptibilidad al ataque por el patógeno, mientras que al inhibir la actividad de la proteína TOR con fármacos o utilizar plantas interferentes en raptor (RNAi), estas mostraron mayor resistencia al ataque por el patógeno, disminuyendo el tamaño de la lesión en las hojas y las unidades formadoras de colonias (UFC). En general se ha observado que la regulación negativa o la inhibición de la proteína TOR estimula la inmunidad y la resistencia a patógenos en plántulas de *Arabidopsis* (Meteignier *et al.*, 2017), plantas de tomate (Marash *et al.*, 2022) y de arroz (De Vleesschauwer *et al.*, 2018) contra diversos patógenos como bacterias, hongos y virus (Schepetilnikov *et al.*, 2011; Meteignier *et al.*, 2017 Aznar *et al.*, 2018; De Vleesschauwer *et al.*, 2018), lo cual indica que para hacer frente al ataque por patógenos la proteína TOR debe ser regulada negativamente.

La señalización de la proteína SnRK1 se activa en condiciones que comprometen la producción de energía. Recientemente se ha informado de su papel frente al ataque por patógenos. Filipe *et al.* (2018) evaluaron el papel de la proteína SnRK1 frente al ataque por tres diferentes patógenos fúngicos (*Magnaporthe oryzae*, *Cochliobolus miyabeanus* y *Rhizoctonia solani*), utilizando plantas de arroz *OX-SnRK1* y *RNAi-SnRK1* y observaron que las líneas *OX-SnRK1* mostraron mayor resistencia frente al ataque por los diferentes patógenos, mientras que las plantas *RNAi-SnRK1* fueron más susceptibles. Resultados similares encontraron Hao *et al.* (2003) en plantas de tabaco infectadas por geminivirus. Observaron que el silenciamiento de *SnRK1α* provoca una mayor susceptibilidad a la infección, mientras que la sobreexpresión de *SnRK1α* conduce a una mayor resistencia. Estos resultados indican que la activación de la proteína SnRK1 es necesaria para hacer frente al ataque por patógenos. Existen otros estudios que refuerzan esta idea, ya que se ha informado que diversas proteínas virales pueden actuar directamente sobre la proteína SnRK1 o aguas arriba para inactivarla (Hao *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Shen y Hanley-Bowdoin, 2006; Shen *et al.*, 2009). Incluso algunas proteínas bacterianas como AvrBsT producida por *Xanthomonas campestris pv* han mostrado regular negativamente a la proteína SnRK1 (Szczyzny *et al.*, 2010).

Hasta aquí es evidente el papel diferencial que tienen las proteínas TOR y SnRK1 durante el ataque por una gran variedad de patógenos, y dado que la interacción planta-microrganismo es a través de diversas moléculas, resulta interesante el estudio de estas como posibles moduladores de la actividad de estos reguladores metabólicos.

2.4 La señalización de TOR atenúa la acción de las hormonas inmunitarias ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA).

Los estudios sugieren que la actividad reducida de la proteína TOR promueve la resistencia de las plantas a los patógenos. Sin embargo, no está claro el mecanismo molecular por el cual la proteína TOR afecta la respuesta a la enfermedad. De Vleeschauwer *et al.* (2018) observaron que la proteína TOR inhibe los factores de transcripción relacionados con la defensa, así como la señalización del JA y el SA, y con ello la resistencia a una variedad de patógenos. En otro estudio Marash *et al.* (2022) observaron que la inhibición de la proteína TOR puede estimular la inmunidad del tomate y la resistencia a enfermedades provocadas por hongos, bacterias y virus de una manera dependiente de SA. Lo cual parece indicar que hay una diafonía entre la inhibición de la proteína TOR y la señalización de algunas fitohormonas como SA durante la señalización de defensa en la planta.

Solís-Ortiz *et al.* (2022) observaron una inducción de fitohormonas de la defensa como JA y SA en el tratamiento con los factores de virulencia PYO y RL, teniendo en cuenta que existe un antagonismo entre la vía del SA y la activación de la proteína TOR durante la inmunidad en plantas (Marash *et al.*, 2022), posiblemente haya una regulación en la actividad de TOR durante la señalización de estas fitohormonas y una modificación en los procesos que regula esta proteína.

3. Justificación

Las interacciones entre planta-microorganismo a través de la influencia de sustancias químicas, pueden ser benéficas o perjudiciales para la planta repercutiendo así en el crecimiento y desarrollo de esta. Particularmente los factores de virulencia producidos por *Pseudomonas aeruginosa* han mostrado tener un efecto en la regulación de estos procesos en *Arabidopsis thaliana*. Este tipo de estrés es percibido a través de diferentes vías de señalización, dentro de estas las cinasas TOR y SnRK1 actúan de manera opuesta en la regulación del metabolismo celular en respuesta a las condiciones favorables o de estrés ambiental. Se conoce poco acerca de cómo participan o se modifican estas vías de señalización en las plantas ante la exposición a factores de virulencia producidos por bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*.

4. Hipótesis

Los factores de virulencia piocianina y ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* modulan el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*, a través de la inhibición de la actividad de la proteína TOR y la activación de la proteína SnRK1.

5. Objetivos

5.1 General

Determinar el papel de las proteínas TOR y SnRK1 en el efecto de los factores de virulencia piocianina y ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* sobre el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.

5.2 Particulares

1. Establecer la participación de las proteínas TOR y SnRK1 en el efecto de la piocianina y los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* sobre el crecimiento y desarrollo en plántulas de *A. thaliana*.

2. Establecer el efecto de la piocianina y los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* sobre la actividad de las proteínas cinasas TOR y SnRK1 en plántulas de *A. thaliana*.

6. Materiales y métodos

Para todos los experimentos realizados se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo silvestre Col-0 y líneas mutantes *kin10* (SALK_127939C) y *raptor1b* (SALK_078159), las cuales fueron amablemente proporcionadas por la Dra. Diane C. Bassham, Iowa State University. Todos los reactivos fueron comprados de casas comerciales de acuerdo con las especificaciones necesarias para cada experimento como se describe en los apartados siguientes. En la tabla 1 se muestran los tratamientos y las concentraciones que se usaron de los reactivos durante la realización de este trabajo.

Tratamientos
C: control
PYO: piocianina (4 µg/ml)
RL: ramnolípidos (40 µg/ml)
PYO+ RL: piocianina (4 µg/ml) + ramnolípidos (40 µg/ml)
AZD: AZD8055 (2 µM)
DORSO: dorsomorfina (5 µM)
PYO+AZD: piocianina (4 µg/ml) + AZD8055 (2 µM)
PYO+AZD: piocianina (4 µg/ml) + dorsomorfina (5 µM)

Tabla 1. Tratamientos y concentraciones de los reactivos.

6.1 Condiciones de crecimiento de las plantas

Las semillas se desinfectaron en la superficie con etanol al 70% (v/v) durante 5 min y una solución comercial de lejía al 20% (v/v) durante 5 min. Después de siete lavados con agua destilada estéril, se realizó la vernalización a 4 °C durante 48 h. Las semillas germinadas se cultivaron en placas de agar que contenían un medio Murashige y Skoog (MS, phytotechlab) 0,2x (0,866 g/L de sales que carecen de aminoácidos y vitaminas, 10 g / L de fitoagar [grado de micropropagación] y 6 g/L de sacarosa). Posteriormente las plantas se colocaron en una cámara de crecimiento vegetal (Percival Scientific AR-95 L, Perry, Iowa, EE. UU.) con un fotoperiodo de 16/8 h de luz/oscuridad (intensidad de luz de 100 µmol m²/s), 80% de humedad y una temperatura de 22 °C.

6.2 Preparación de los medios suplementados con los factores de virulencia

Los factores de virulencia piocianina (P0046, Sigma-Aldrich) y ramnolípidos (R90, Sigma-Aldrich) fueron utilizados en este estudio a una concentración de 4 µg/ml y 40 µg/ml respectivamente, estas concentraciones se eligieron previamente a partir de una curva de crecimiento de las plántulas expuestas a distintas concentraciones con ambos factores de virulencia (datos no mostrados) en función del efecto negativo que mostraban sobre el crecimiento de la planta. La preparación de los medios se realizó de la siguiente manera, los factores de virulencia fueron vertidos a medio MS tibio el cual fue mezclado uniformemente, y posteriormente vertido en placas Petri donde se dejó solidificar.

6.3 Preparación de los medios suplementados con los inhibidores

Se utilizaron los inhibidores de TOR, AZD8055 Base (A-2345 LC Laboratories) y la Dorsomorfina (P5499, Sigma-Aldrich) inhibidor de la proteína SnRK1, estos fueron vertidos a medio MS tibio donde se mezclaron uniformemente, una vez mezclados, el medio se vertió en placas Petri donde se dejó solidificar.

6.4 Evaluación del crecimiento y desarrollo de las plántulas

Para evaluar el crecimiento de las plántulas se midió la longitud de la raíz primaria, con una regla, y se cuantificó con ayuda de un microscopio estereoscópico (Luxeo 4D, Labomed) el número de raíces laterales y adventicias en una muestra de al menos 12 plantas de 3 placas independientes.

6.5 Extracción de proteínas citoplasmáticas

Las plántulas de *Arabidopsis thaliana* de diferentes tratamientos se trituraron en nitrógeno líquido. El polvo resultante se transfirió a un microtubo con un tampón de extracción (σ -vanadato de sodio 1 mM, molibdato de sodio 1 mM, benzamidina 1 mM, fluoruro de sodio 20 mM, fenilmetilsulfonilo fluoruro 0,2 mM, ditiotreitól 2 mM, ácido 4- (2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfónico 50 mM, pH 7,6). Después se agitó con vórtex, y el homogeneizado se centrifugó a 9000 × g 4 °C durante 30 min. El sobrenadante se recuperó y se cuantificó la proteína utilizando el método de Bradford (1976).

6.6 Electroforesis

La electroforesis se llevó a cabo mediante el protocolo descrito por Towbin *et al.* (1979). Las muestras se prepararon de la siguiente manera; se tomaron los μL correspondientes del homogeneizado de planta de cada uno de los diferentes tratamientos para cargar un total de 80 μg de proteína, la cual, fue mezclada dentro de un microtubo con un volumen igual de tampón de solubilización (Tris/HCl 0.250M pH 6.8, SDS 8%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 20%, azul de bromofenol 100 μL y H_2O cbp 5 ml), enseguida se hirvieron a 95 °C durante 3 minutos y posteriormente se cargaron las muestras en los geles de poliacrilamida al 12% bajo condiciones desnaturalizantes y se aplicó una corriente eléctrica de 90 V durante 10 minutos y después se aumentó a 120 V durante 70 min aproximadamente.

6.7 Transferencia de las proteínas

Las proteínas fueron transferidas a membranas de fluoruro de polivinildieno (PVDF) de acuerdo con el protocolo empleado por Laemmli *et al.* (1970). Las membranas de PVDF fueron cortadas cuidadosamente a la medida del gel (aproximadamente 8 X 6 cm), para lo cual se utilizaron guantes de látex. Para hidratar las membranas fue necesario sumergir en metanol absoluto por 30 segundos, después se retiró el metanol y posteriormente se colocó en agua desionizada durante 5 minutos para lavar el exceso de metanol; luego se retiró el agua desionizada y se colocó en tampón de transferencia (Tris 25 mM y metanol 20%, pH 10.4) durante 10 minutos, a la par el gel se colocó durante 15 min en buffer de transferencia (Ácido-6-aminocaproico 10 mM y metanol 20%, pH 7.2). A continuación, Se coloca 1 papel whatman (del tamaño de la membrana) empapado de buffer (Tris 0.3 M y metanol 20%, pH 10.4) sobre la superficie de la cámara de transferencia, seguido de dos papeles empapados en el buffer donde se encuentra sumergida la membrana, la cual se coloca enseguida, posteriormente el gel de poliacrilamida se coloca sobre la membrana, en este paso revisó que no quedaran burbujas entre el gel y la membrana para evitar una mala transferencia de las proteínas, por último se colocaron tres papeles empapados del buffer donde se encontraba sumergido el gel, creando una especie de sándwich, finalmente se procedió a cerrar la cámara

de transferencia y se programó durante una hora con una intensidad eléctrica de 48 amperios, determinados por las medidas de la membrana (8 cm x 6 cm).

6.8 Inmunodetección de las proteínas

Una vez finalizada la transferencia, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau para observar la eficiente transferencia de las proteínas. Después el rojo de Ponceau fue retirado con 4 lavados de H₂O desionizada y para desteñirla totalmente se lavó con TBS-T 0.15 M (Tris/HCl 50 mM, NaCl 0.15 M, Tween-20 0.1%), durante 5 minutos. Para bloquear los sitios inespecíficos la membrana se colocó en TBS-T 0.15 M y polivinil 5% durante 60 minutos. Posteriormente la membrana se lavó con TBS-T 0.15 M de 2 a 3 veces para eliminar el exceso de polivinil, manejando en todo momento la membrana con pinzas. Para incubar con el anticuerpo primario, las membranas se colocaron en 50 mL de TBS 0.15M y polivinil 5%, y se agregó el anticuerpo específico para P70 S6 Kinase (#9202) y p-P70 S6 T389 (#9205), a una dilución 1:5000 y se dejaron en agitación constante durante toda la noche en refrigeración, transcurrido el respectivo tiempo de incubación se hicieron 3 lavados a las membranas con TBS-T 0.15 M durante 10 minutos cada una. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario policlonal (sc-2005) IgG acoplado a peroxidasa (HRP) correspondiente, a una dilución de 1:10000 en 50 ml de TBS 0.15M y polivinil 5% por 2 horas; y posteriormente se hicieron 3 lavados con TBS-T 0.15M de 10 minutos cada lavado.

6.1 Revelado y análisis densitométrico de las proteínas

La interacción antígeno-anticuerpo se analizó mediante quimioluminiscencia y las imágenes se obtuvieron empleando un fotodocumentador marca BioRad (Chemi Doc MP, Imaging System). El análisis densitométrico se realizó en el programa imageJ en el cual se procesaron las imágenes digitales obtenidas en el fotodocumentador. La abundancia relativa de las diferentes proteínas se obtuvo a través de la multiplicación del área seleccionada por intensidad de píxel. el resultado obtenido se graficó y se comparó para observar si existían diferencias.

6.2 Detección de especies reactivas de oxígeno

6.2.1 Determinación de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) con nitroazul de tetrazolio (NBT)

La detección de $O_2^{\cdot-}$ se realizó como describe Ramel *et al.* (2009). Las plántulas de 6 días de crecimiento se sumergieron e infiltraron al vacío con solución de tinción de 1 mg/ml de NBT (N6495-Invitrogen) en tampón de fosfato de potasio (10 mM), con NaN_3 (10 mM). Después de la infiltración durante 2-3 h, las plántulas teñidas se hirvieron en una solución de ácido acético: glicerol: etanol (1:1:3, v/v/v) durante 10 min. Luego, las muestras se almacenaron en etanol al 95 % (v/v) hasta el escaneo. El $O_2^{\cdot-}$ se visualizó como un color azul producido por la reducción de NBT a formazán. Las plantas se observaron y fotografiaron con un microscopio de contraste (Nomarsky) Leica DM 5500 B. El color azul que es proporcional a la cantidad de ERO totales, la abundancia relativa fue cuantificada mediante el programa ImageJ eligiendo una misma área comparativa entre las plantas de los diferentes tratamientos.

6.2.2 Determinación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) con diaminobencidina (DAB)

Para la detección de H_2O_2 , se utilizó el agente de tinción DAB (D8001-5G, Sigma-Aldrich) a una concentración de 1 mg/ml. Este se disolvió en H_2O y se ajustó a pH 3,8 con HCl. La solución DAB se preparó para evitar la autooxidación. Las plántulas de 6 días de crecimiento se sumergieron en la solución durante 2-3 horas. A continuación, las plántulas teñidas se hirvieron en una solución de ácido acético: glicerol: etanol (1:1:3, v/v/v) durante 10 min y luego se almacenaron en etanol al 95 % (v/v) hasta el escaneo. Las plantas se observaron y fotografiaron con un microscopio de contraste (Nomarsky) Leica DM 5500 B. El peróxido de hidrogeno se visualizó como un color marrón debido a la polimerización DAB, que es directamente proporcional a la cantidad de H_2O_2 (Ramel *et al.*, 2009).

6.3 Microscopía y tinción de cuerpos autofágicos

La solución de trabajo para la detección de autofagosomas, se preparó como se describe en la ficha técnica del kit de ensayo de autofagia (MAK138, Sigma-Aldrich).

Se diluyeron 20 μL de la solución 500X con 10,000 μL de buffer de teñido. Posteriormente se retiró el medio con los tratamientos (C, AZD, DOR, PYO y su combinación) de cada uno de los pocillos de la placa donde estaban contenidas las plántulas de las tres líneas mencionadas anteriormente y se añadieron 200 μL de la solución para detección de autofagosomas. Transcurridos 15 min de incubación, se retiró la solución de detección de autofagosomas y posteriormente las plántulas se lavaron suavemente con el buffer de lavado agregando un volumen de 200 μL a cada pocillo. Las plántulas fueron observadas utilizando microscopía confocal, en la instalación confocal del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (Cinvestav Irapuato). Las longitudes de onda de excitación y emisión para fueron de 360 y 520 nm respectivamente.

6.1 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos y determinaciones, se expresa como la media \pm desviación estándar con al menos una $n=3$. Los mismos que se procesaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y las medias se compararon con la prueba post-hoc de Tukey con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

7. Resultados

7.1 Efecto de la piocianina sobre el crecimiento y desarrollo de la raíz en plántulas Col-0, *kin10* y *raptor1b* en *A. thaliana*.

Como se mencionó anteriormente los factores de virulencia favorecen la invasión y la resistencia de los patógenos a las defensas del huésped. La piocianina es un importante factor de virulencia secretado por *P. aeruginosa* el cual posee actividad redox y potencialmente puede incrementar los niveles intracelulares de ERO (Hall *et al.*, 2016). Para evaluar el efecto que tiene este metabolito sobre las proteínas cinasas TOR y SnRK1, se utilizaron plántulas del ecotipo Col-0, y de las líneas mutantes *kin10* y *raptor1b* en *Arabidopsis*. Las plántulas de 6 días de crecimiento se transfirieron a medio MS el cual contenía piocianina a una concentración 4 $\mu\text{g/ml}$. Trascurridos 10 días después de la transferencia se evaluó el desarrollo de la

arquitectura radicular y se observó que el crecimiento de la raíz principal se detiene en las tres líneas Col-0, *kin10* y *raptor1b* (figura 5).

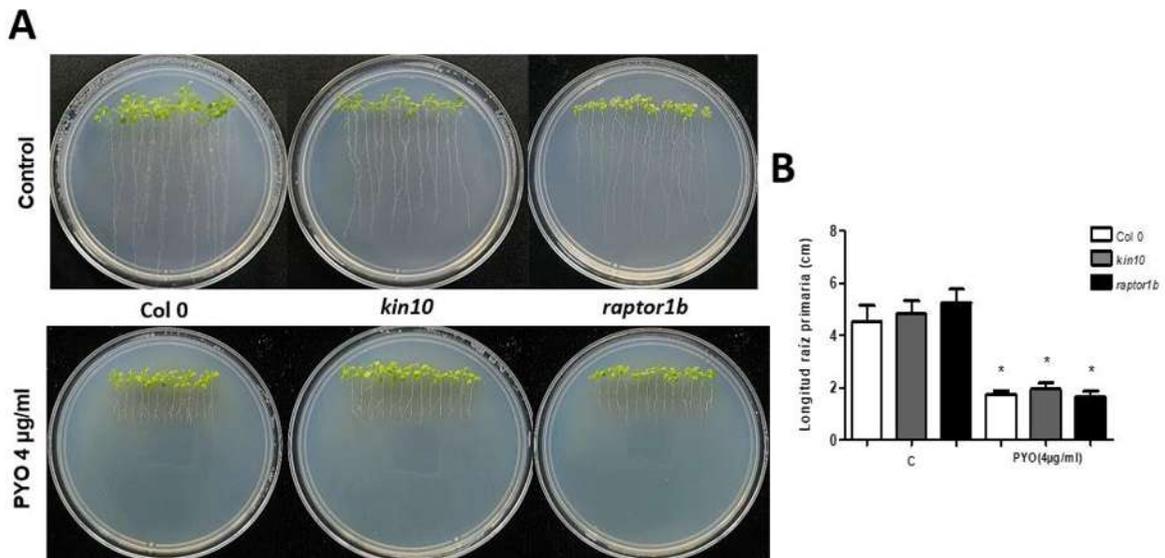


Figura 5. Efecto de la piocianina sobre el crecimiento y desarrollo de la raíz en plántulas Col-0, *kin10* y *raptor1b* en *A. thaliana*. A) fotografías representativas de las plántulas expuestas a la piocianina después de 10 días de tratamiento. B) Análisis estadístico de la longitud de la raíz. Se muestra la media \pm DE (n = 10) de al menos 3 replicas. ANOVA de 1 vía, prueba post-hoc Tukey, $p < 0.05$

Los resultados muestran que el crecimiento de la raíz principal se inhibe ante la exposición con la piocianina, lo cual probablemente se correlaciona con una alteración del estado redox en las puntas de la raíz. Sin embargo, no se observaron cambios en el fenotipo entre las líneas mutantes *kin10* y *raptor1b* por lo que hasta este punto no queda claro si las cinasas TOR y SnRK1 están involucradas en la modulación del crecimiento de la raíz por la piocianina.

7.2 Efecto de los ramnolípidos sobre el crecimiento y desarrollo de la raíz en plántulas Col-0, *kin10* y *raptor1b* en *A. thaliana*.

Los ramnolípidos por su naturaleza anfifílica actúan como biosurfactantes, de manera que disminuyen la tensión entre dos fases. Por esta propiedad son esenciales para la diseminación de la superficie bacteriana y el desarrollo normal de biopelículas (Chrzanowski *et al.*, 2012). A medida que estos compuestos se liberan en el medio extracelular, tienen el potencial de ser percibidos por la planta (Schellenberger *et al.*, 2021). Para evaluar el efecto que tienen sobre las cinasas

SnRK1 y TOR se utilizaron plántulas del ecotipo Col-0, y líneas mutantes *kin10* y *raptor1b* en *Arabidopsis*. Las plántulas de 6 días de crecimiento se transfirieron a medio MS el cual contenía RL a una concentración 40 µg/ml. Trascurridos 10 días después de la transferencia se evaluó la arquitectura radicular y se observó que el crecimiento de la raíz principal se detiene en las líneas Col-0 y la mutante *kin10* y en su lugar surge el crecimiento de raíces adventicias las cuales alcanzan un tamaño considerable. Mientras que, la mutante *raptor1b* se comporta de manera diferente, muestra resistencia a la exposición con los RL, el crecimiento de la raíz principal se mantiene hasta finalizar el tratamiento (figura 6A).

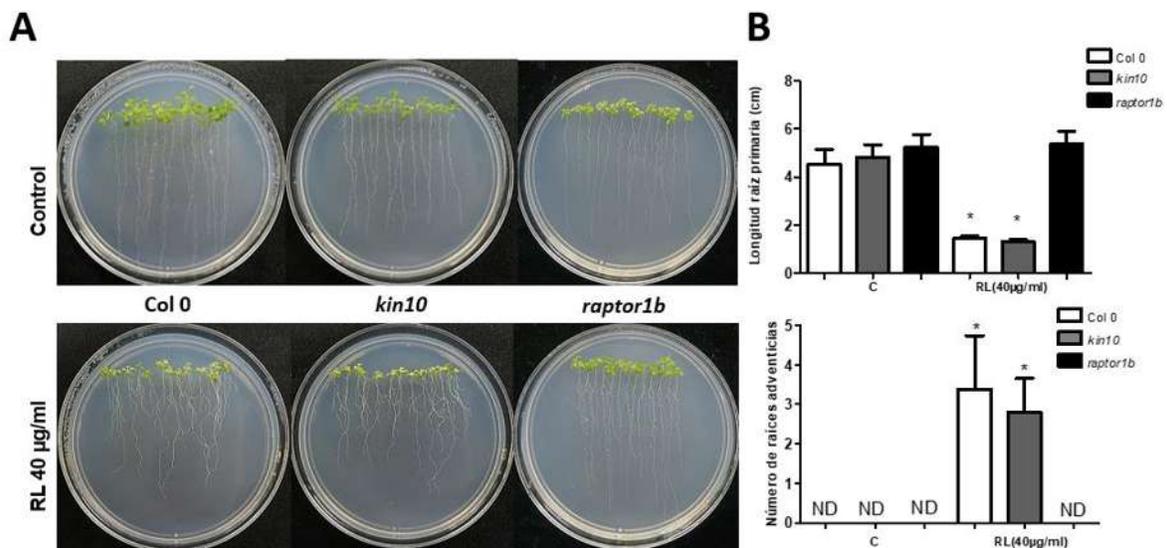


Figura 6. Efecto de los ramnolípidos sobre el crecimiento y desarrollo de la raíz en plántulas Col-0, *kin10* y *raptor1b* en *A. thaliana*. **A)** fotografías representativas de las plántulas expuestas a los ramnolípidos después de 10 días de tratamiento. **B)** Análisis estadístico de la longitud de la raíz y la formación de raíces adventicias. Se muestra la media \pm DE (n = 10) de al menos 3 replicas. ANOVA de 1 vía, prueba post-hoc Tukey, $p < 0.05$. Los * indican diferencia significativa entre los tratamientos.

Estos resultados indican que la percepción de los ramnolípidos por la planta involucra la participación de la cinasa TOR en la modulación del sistema radicular, ya que la actividad a la baja de esta proteína en la mutante *raptor1b* no responde al efecto que tienen estas moléculas sobre las líneas Col-0 y la mutante *kin10* (figura 6B).

7.3 Efecto de la combinación piocianina + ramnolípidos sobre el crecimiento y desarrollo de raíz en plántulas Col-0, *kin10* y *raptor1b* en *A. thaliana*

La piocianina y los ramnolípidos son dos factores de virulencia muy importantes para la patogenicidad de las bacterias que los producen y ambos contribuyen a la arquitectura del biofilm por lo que están involucrados en la persistencia de las infecciones (Thi *et al.*, 2020; Zeng *et al.*, 2020). Por ende, fue de interés evaluar si tenían algún efecto sinérgico al ponerlos en conjunto dentro del medio en interacción con las plántulas. Lo que se observó fue la inhibición del crecimiento de la raíz principal en las tres líneas, algo que ya se había observado con ambos factores por separado, sin embargo, hay aparición de raíces adventicias un efecto de que se observó solo con la exposición a los ramnolípidos en las líneas Col-0 y *kin10*; no obstante, con la combinación de ambos factores estas raíces alcanzan un tamaño menor (figura 7A).

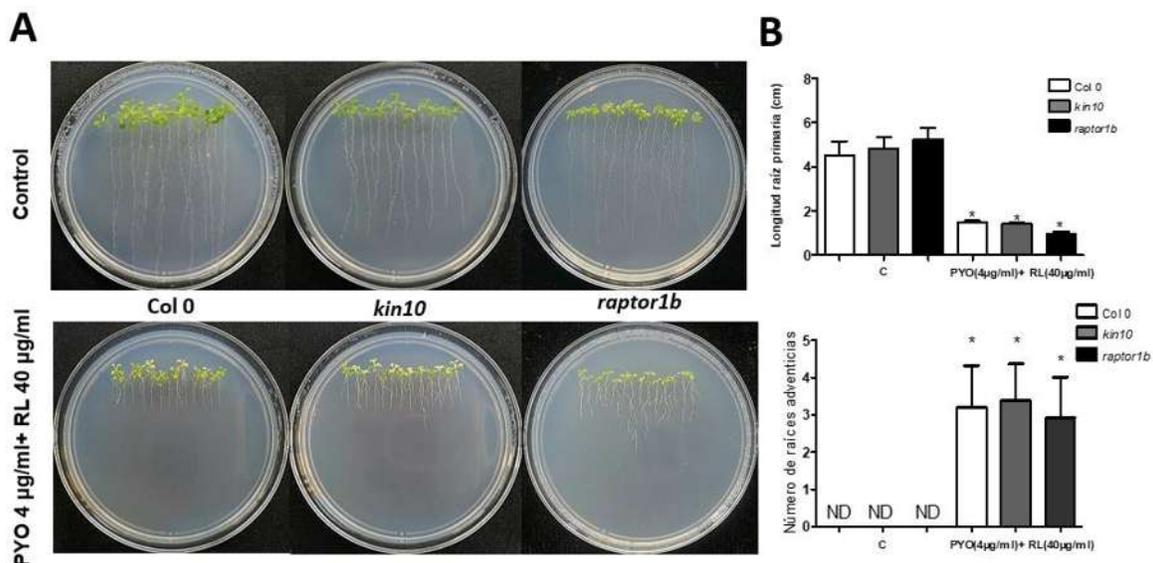


Figura 7. Efecto de la combinación de piocianina+ ramnolípidos sobre el crecimiento y desarrollo de la raíz en plántulas Col-0, *kin10* y *raptor1b* en *A. thaliana*. A) Fotografías representativas de las plántulas expuestas a la combinación de la piocianina y los ramnolípidos después de 10 días de tratamiento. B) Análisis estadístico de la longitud de la raíz la formación de raíces adventicias. Se muestra la media \pm DE (n = 10) de al menos 3 replicas. ANOVA de 1 vía, prueba post-hoc Tukey, $p < 0.05$. Los * indican diferencia significativa entre los tratamientos.

Curiosamente en la mutante *raptor1b* también surgieron raíces adventicias algo que no se observó durante la exposición a los ramnolípidos, sin embargo, en

combinación con la piocianina emergieron, probablemente por un mecanismo distinto al que tienen los ramnolípidos (figura 7B).

7.4 Efecto de la exposición a la piocianina y a los ramnolípidos de *P. aeruginosa*, sobre los niveles de fosforilación de la proteína cinasa S6 en plántulas Col-0, *kin10* y *raptor1b* en *A. thaliana*.

Una vez que se evaluó la respuesta fenotípica de las plántulas de las diferentes líneas, se procedió a evaluar los niveles de fosforilación de la cinasa de la proteína ribosómica S6 (S6K) un sustrato muy estudiado de la proteína TOR (Xiong y Sheen, 2014). Se observó un ligero aumento en la fosforilación de la proteína S6K en el tratamiento control de la mutante *kin10* lo cual tiene que ver con el hecho de que SnRK1 ejerce cierta regulación negativa sobre la proteína TOR, en contraste con lo que se observó en la mutante *raptor1b*, en la cual la fosforilación de la proteína S6K disminuye ligeramente con respecto a *kin10*, lo cual también está en concordancia con la mutación en el gen *raptor1b*. Sin embargo, aunque había una tendencia en la disminución de la fosforilación de la proteína S6K con los tratamientos, esta no fue significativa (figura 8), los datos obtenidos hasta el momento no eran concluyentes, por lo que, se monitoreó la actividad de la proteína TOR en periodos de tiempo más cortos.

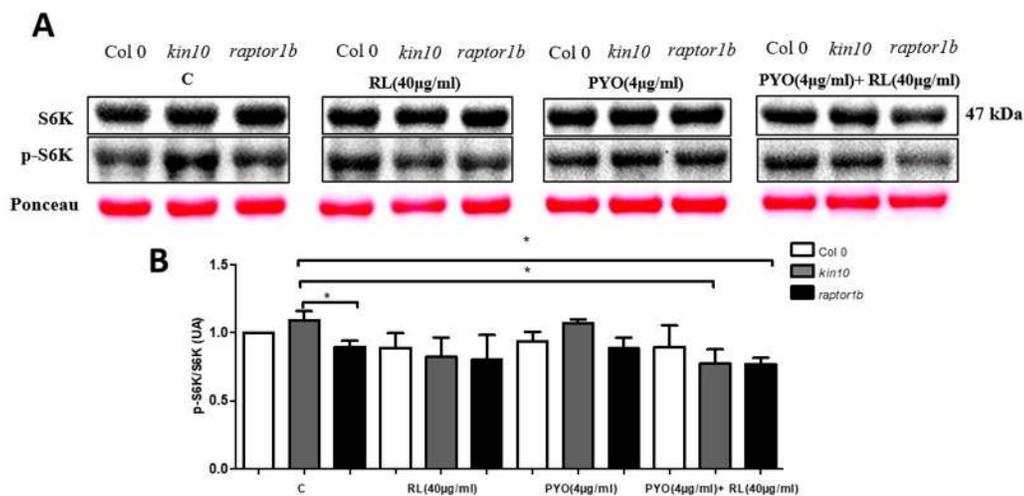


Figura 8. Efecto de la exposición a la piocianina y los ramnolípidos de *P. aeruginosa*, sobre los niveles de fosforilación de la proteína cinasa S6 en plántulas Col-0, *kin10* y *raptor1b* en *A. thaliana*. **A)** Análisis representativo de Inmunodetección de la proteína S6K **B)** análisis estadístico de la relación p-S6K/S6K. Se muestra la media \pm DE (n = 3). ANOVA de 1 vía, prueba post-hoc tukey $p < 0.05$. Los * indican diferencia significativa entre los tratamientos señalados con los corchetes.

7.5 Efecto de la exposición a la piocianina y a los ramnolípidos, a 6, 8, 10 y 12 horas, sobre los niveles de fosforilación de la cinasa de la proteína ribosómica S6 (S6K) en plántulas Col-0 en *A. thaliana*.

La fosforilación de las proteínas se produce de forma transitoria, la acción conjunta de proteínas cinasas (fosforilan) y fosfatasas (desfosforilan) sirve como interruptor molecular que enciende y apaga respuestas celulares, en respuesta a un estímulo (Gutiérrez Venegas, 2010). Esto llevó a monitorear la actividad de la proteína TOR en periodos de tiempo más cortos. Se establecieron tiempos de 6, 8, 10 y 12 horas de exposición a los factores de virulencia. Como se puede observar en la figura 9, no hay cambios visibles en los niveles de fosforilación de la proteína S6K a las 6 horas con la exposición a los factores de virulencia, pero a las 8 horas se muestra una disminución en la fosforilación con el tratamiento con la PYO y en el tratamiento con la combinación de los factores de virulencia, no siendo así con el tratamiento con los RL, lo que llevó a pensar que era la PYO quien estaba teniendo un efecto negativo sobre la vía de señalización del complejo TOR al menos a las 8 horas de exposición, porque en las siguientes 10 y 12 horas se restablecían los niveles de fosforilación de la proteína S6K (figura 9).

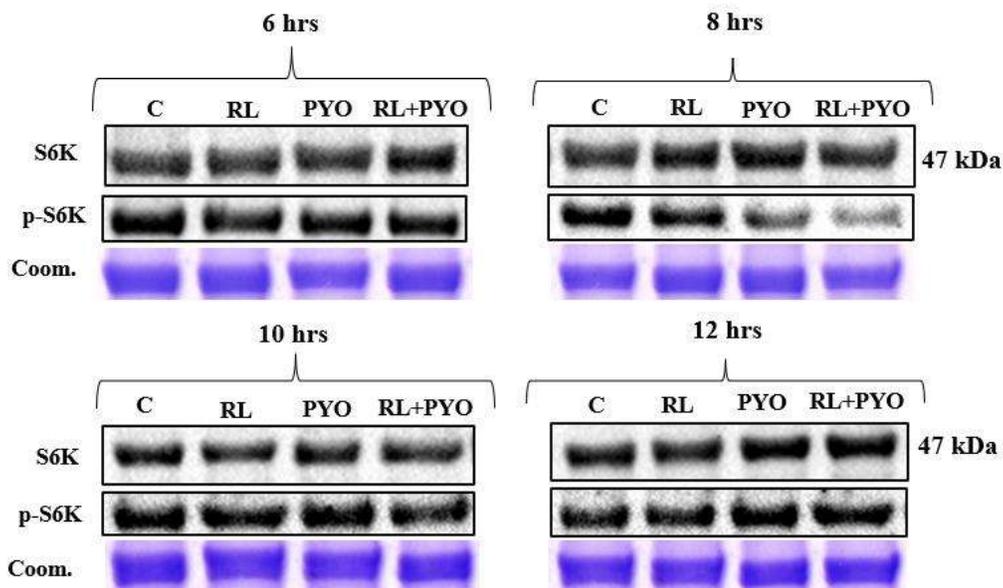


Figura 9. Efecto de la exposición a la piocianina y los ramnolípidos, a 6, 8, 10 y 12 horas, sobre los niveles de fosforilación de la cinasa de la proteína ribosómica S6 (S6K) en plántulas Col-0 en *A. thaliana*. Análisis representativo de Inmunodetección de la proteína S6K.

Con base en estos resultados, se eligió el protocolo con el tratamiento de 8 horas para experimentos posteriores.

7.6 Efecto de la piocianina y ramnolípidos, a 8 horas de exposición, sobre los niveles de fosforilación de la cinasa de la proteína ribosómica S6 (S6K) en plántulas Col-0, *kin10* y *raptor1b* en *A. thaliana*

Se evaluaron los niveles de fosforilación de S6K en las plántulas de las mutantes *kin10* y *raptor1b*, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en Col-0 y la mutante *raptor1b* en el tratamiento con los ramnolípidos y aunque parece disminuir la banda de fosforilación en la mutante *raptor1b*, la banda que corresponde a la expresión de esta también disminuye, por lo que la relación entre las dos bandas indica que todo lo que se expresa se fosforila, por ende, no hay cambios en la actividad de S6K (figura 10).

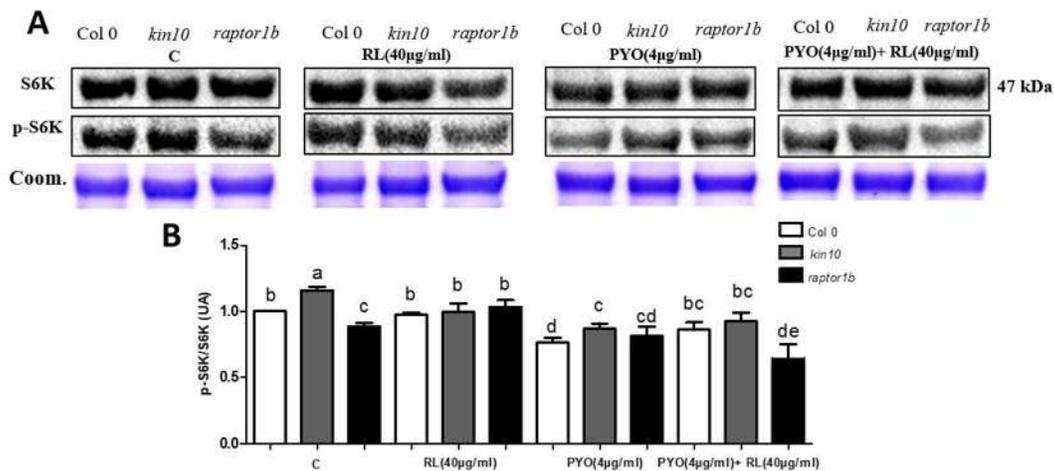


Figura 10. Efecto de la piocianina y ramnolípidos, a 8 horas de exposición, sobre los niveles de fosforilación de la cinasa de la proteína ribosómica S6 (S6K) en plántulas Col-0, *kin10* y *raptor1b* en *A. thaliana*. A) Análisis representativo de Inmunodetección de la proteína S6K B) análisis estadístico de la relación p-S6K/S6K. Se muestra la media \pm DE (n = 3). ANOVA de 1 vía, prueba post-hoc tukey $p < 0.05$. Letras diferentes indican diferencia significativa entre los tratamientos.

Por otro lado, el tratamiento con la piocianina si disminuye los niveles de fosforilación en las tres líneas en al menos un 20%, lo cual indica una modulación negativa en la vía de señalización de la proteína TOR, mientras que en la combinación de ambos factores de virulencia no está claro el efecto, parece aumentar levemente la fosforilación de S6K con respecto al tratamiento con la

piocianina, por lo cual, decidimos realizar más estudios, pero únicamente con la PYO.

7.7 La piocianina incrementa los niveles de acumulación de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en las puntas de las raíces de plántulas Col-0, *kin10* y *raptor1b* en *A. thaliana*

En función de que se detectó una disminución en la fosforilación de la proteína cinasa S6K con la piocianina, se procedió a analizar más a fondo el posible mecanismo por el cual la PYO podría estar disminuyendo la actividad de la proteína TOR. Por lo cual se decidió evaluar el papel de las especies reactivas de oxígeno como un posible inhibidor de la actividad de este regulador metabólico. Además de emplear las líneas mutantes *kin10* y *raptor1b*, se empleó los fármacos AZD y dorsomorfina para la inhibición de las proteínas TOR y SnRK1 respectivamente. En la figura 11 se observa un aumento significativo en la concentración de $O_2^{\cdot-}$ en la raíz de las plántulas de las líneas Col-0, *kin10* y *raptor1b* con el tratamiento con la piocianina en comparación con el tratamiento control.

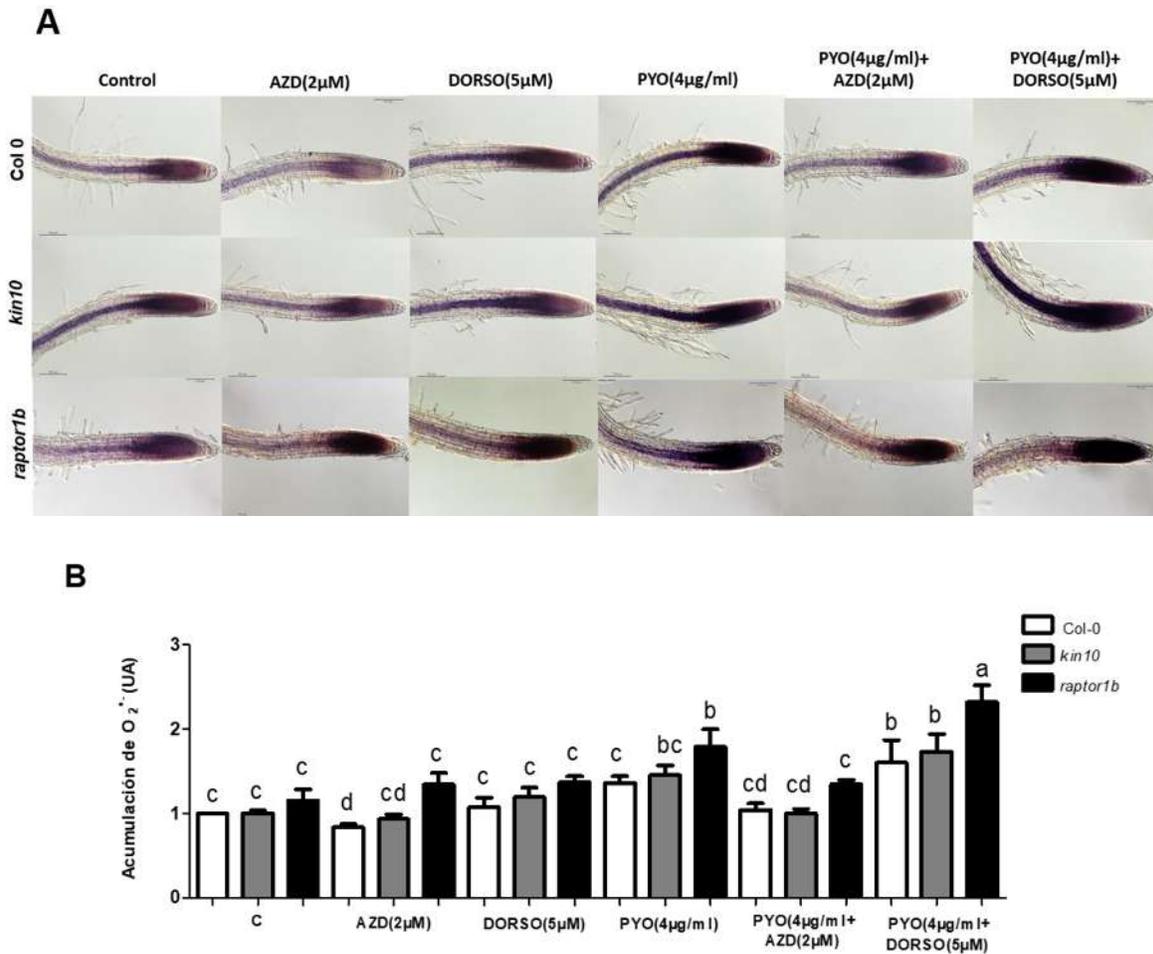


Figura 11. Acumulación de $O_2^{\bullet-}$ en las puntas de raíces de Col-0, *kin10* y *raptor1b* frente a la exposición con PYO. A) Fotografías representativas de las plantas teñidas con NBT 1mg/ml e incubadas durante 2-3 horas. **B)** PYO incrementa la acumulación de $O_2^{\bullet-}$ de manera significativa con respecto al control en Col-0 y las mutantes *kin10* y *raptor 1b*. Se muestra la media \pm DE (n = 3). ANOVA de 1 vía, prueba post-hoc tukey $p < 0.05$. Letras diferentes indican diferencia significativa entre los tratamientos.

El inhibidor de la proteína TOR, AZD disminuye ligeramente la producción de $O_2^{\bullet-}$ en la punta de la raíz en las líneas Col-0 y *kin10*. La aplicación de la PYO incrementa la concentración de $O_2^{\bullet-}$ en las tres líneas, lo cual es más evidente en la mutante *raptor1b*, donde se observa un incremento de un 80% con respecto control. Por otro lado, observamos que con el tratamiento con dorsomorfina se mantienen muy similares los niveles de superóxido con los de los controles de las tres líneas, sin embargo, al agregar la plicianina al medio con dorsomorfina se incrementan de manera estadísticamente significativa, incluso se puede observar una mayor

intensidad del color azul que en las puntas de las raíces en comparación con el tratamiento solo con la piocianina (figura 11, A). Estos resultados indican que la proteína SnRK1 está involucrada en la regulación del estado redox, ya que cuando esta es inhibida con dorsomorfina hay una acumulación excesiva de anión superóxido.

La piocianina incrementa la acumulación de peróxido de hidrogeno (H₂O₂) en las puntas de las raíces de plántulas Col-0, *kin10* y *raptor1b* en *A. thaliana*

A continuación, se evaluó la concentración de otra de las especies reactivas de oxígeno, el peróxido de hidrogeno. Se observó que de manera similar a la producción de O₂⁻, hay un incremento en la producción de H₂O₂ en el tratamiento con la piocianina en las tres líneas con respecto al control. Se observó también que el tratamiento con AZD disminuye la producción de peróxido de hidrógeno en la zona de diferenciación, así como la formación de pelos radiculares, pero cuando agregamos la PYO, la concentración de H₂O₂ se incrementa, de manera similar a lo que ocurre con el aumento en la concentración de O₂⁻ ante la exposición a la piocianina en el tratamiento con AZD (figura 12), e incluso se puede observar formación de pequeños pelos radiculares.



Figura 12. Acumulación de H₂O₂ en las puntas de raíces de Col-0, *kin10* y *raptor1b* frente a la exposición con PYO. A) Fotografías representativas de las plantas fueron teñidas con DAB 1mg/ml. La PYO incrementa la acumulación de H₂O₂ y la formación de pelos radiculares en Col-0 y las mutantes *kin10* y *raptor 1b*.

Curiosamente el tratamiento con dorsomorfina parece disminuir la formación de pelos radiculares, sin embargo, cuando agregamos la piocianina al medio con este inhibidor se induce la formación de pelos radiculares e incrementa la concentración de H₂O₂, lo cual deja claro que la piocianina incrementa los niveles de ERO, un posible mecanismo por el cual este modulando el crecimiento de la planta.

7.8 La piocianina induce la activación de la autofagia en las puntas de las raíces de plántulas Col-0, *kin10* y *raptor1b* en *A. thaliana*

La autofagia es un proceso catabólico altamente conservado en organismos eucariotas. Se activa ante distintas respuestas de estrés principalmente ante la falta de nutrientes. Sin embargo, recientemente se le ha vinculado con el estrés oxidante, en donde un exceso de especies reactivas induce la activación de la autofagia como un mecanismo antioxidante no canónico para eliminación de productos oxidados (Pérez-Pérez *et al.*, 2012) y dado que las proteínas cinasas TOR y SnRK1 son importantes reguladores de este proceso catabólico, se decidió analizar la activación de esta vía. En la figura 13 se observa una autofagia constitutiva en las tres líneas de plantas, sin embargo, se puede observar una señal mayor de color azul en la línea mutante *raptor1b*, que es proporcional a la cantidad de cuerpos autofágicos formados, una característica importante en la mutante en *raptor1b* (Salem *et al.*, 2018). También se observó que no hay cambios en la inducción de la autofagia con el tratamiento de AZD, mientras que observamos una fuerte inducción de la autofagia con el tratamiento con la dorsomorfina en las tres líneas, lo cual ya había sido observado en células de mamífero (Vucicevic *et al.*, 2011, Yang *et al.*, 2012) sin embargo, el mecanismo por el cual induce autofagia en mamíferos no parece ser el mismo en plantas, ya que en mamíferos requiere una señalización a la baja de la proteína TOR, algo que no vemos nosotros reflejado en los niveles de fosforilación de la S6K el sustrato de la proteína TOR (figura 14).

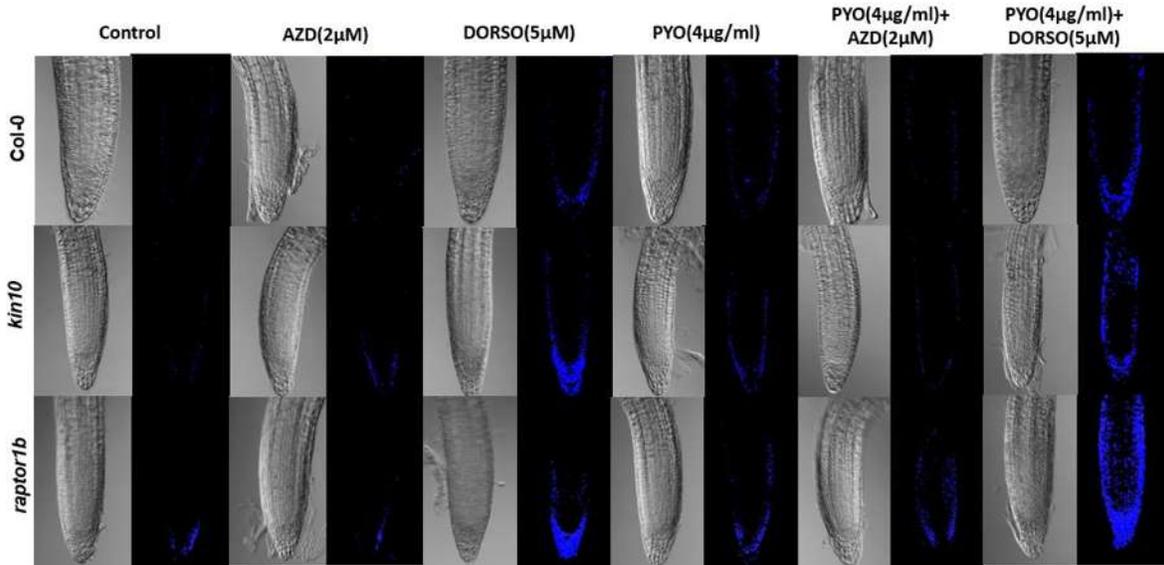


Figura 13. La piocianina induce la formación de cuerpos autofágicos en las líneas Col-0, *kin10* y *raptor1b*. Fotografías representativas de la tinción de cuerpos autofágicos. Para visualizar los autofagosomas en las raíces, se utilizó microscopía de fluorescencia ($\lambda_{ex} = 360/ \lambda_{em} = 520 \text{ nm}$). El color azul es proporcional a la cantidad de autofagosomas formados.

Por otro lado, el tratamiento con la piocianina incrementa la formación de cuerpos autofágicos en comparación con el tratamiento control en las tres líneas, no obstante, esta es aún mayor en la mutante *raptor1b*, donde se puede hasta doble de autofagosomas formados, lo mismo sucede en los tratamientos con la combinación de AZD y la piocianina, donde la inducción de la autofagia es mayor en esta mutante. Interesantemente el tratamiento con la combinación del inhibidor de la proteína SnRK1 y la piocianina se observó una inducción de la autofagia mucho mayor que en el tratamiento solo con dorsomorfina en las tres líneas, aproximadamente del doble de autofagosomas formados, sin embargo, sigue siendo mucho mayor en la mutante *raptor1b* incluso hasta de tres veces más. La piocianina induce autofagia, no obstante, la inhibición o la regulación a la baja de la proteína SnRK1 no induce la activación de este proceso catabólico, lo que apunta a otro mecanismo por el cual dorsomorfina está induciendo la autofagia (Soto-Burgos y Bassham, 2017), sin embargo, es aún desconocido. Hasta el momento estos resultados nos permiten señalar que la piocianina induce la formación de ERO, las cuales inducen estrés oxidativo el cual está induciendo la activación de la

autofagia como un mecanismo de eliminación de productos dañados por un exceso de ERO.

7.9 Efecto de la inhibición de la proteína SnRK1 ante la exposición a la piocianina sobre los niveles de fosforilación de la cinasa de la proteína ribosómica S6 en plántulas Col-0, *kin10* y *raptor1b* en *A. thaliana*

La proteína TOR favorece la activación de procesos anabólicos bajo condiciones favorables, mientras que se encuentra reprimiendo procesos catabólicos como la autofagia, donde fosforila a la proteína ATG13 componente de complejo de iniciación de la autofagia, de esta manera la proteína TOR regula negativamente este proceso mientras que la proteína SnRK1 la regula de manera positiva al fosforilar la otra parte del complejo (ATG1) (Soto-Burgos y Bassham, 2017). Por lo anterior se evaluó nuevamente la actividad de la proteína TOR de manera indirecta a través de los niveles de fosforilación de la proteína S6K. Se observó una disminución de la fosforilación de la proteína S6K en el tratamiento con el inhibidor AZD, así como con el de la piocianina de una manera muy similar (aproximadamente de un 20%), y el tratamiento con la combinación de estos fue muy parecida al de los tratamientos individuales (figura 14). Por otro lado, el tratamiento con el inhibidor de la proteína SnRK1, dorsomorfina, no afectó los niveles de fosforilación de la proteína S6K, sin embargo, al combinar el inhibidor con el tratamiento con la piocianina se observó que los niveles de fosforilación disminuyen de manera significativa, esta regulación a la baja en la actividad de la proteína TOR se debe al efecto que tiene la piocianina, sin embargo al prescindir de la actividad de la proteína SnRK1, posiblemente el incrementando en la inducción de la autofagia se deba a un incremento en el estrés oxidativo que no puede ser mediado por la inhibición de la proteína SnRK1 y no precisamente a la inhibición completa de la proteína TOR (Figura 10).

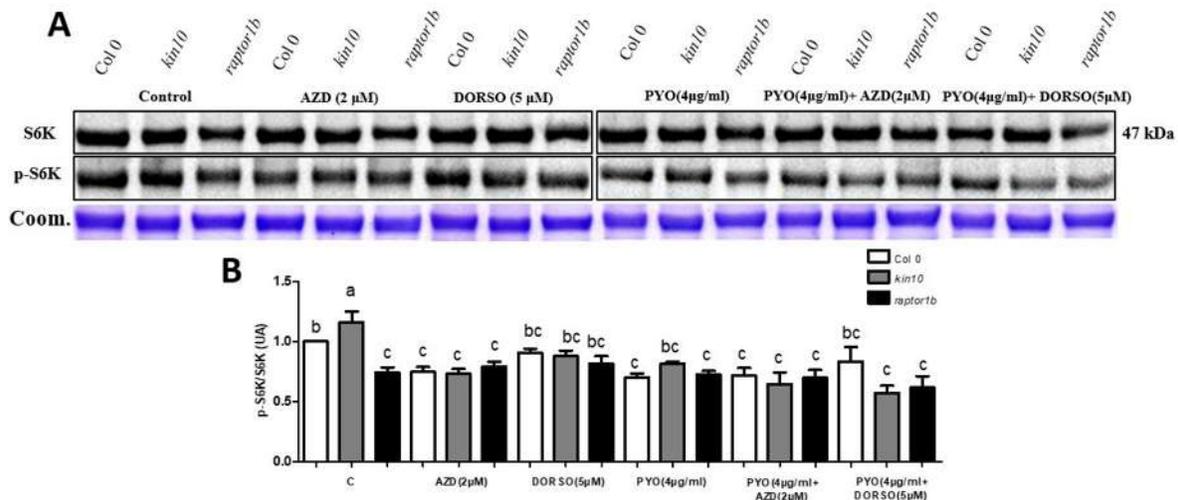


Figura 14. Efecto de la inhibición de la proteína SnRK1 ante la exposición a la piocianina sobre los niveles de fosforilación de la cinasa de la proteína ribosómica S6 en plántulas Col-0, *kin10* y *raptor1b* en *A. thaliana*. A) Análisis representativo de Inmunodetección de la proteína S6K B) análisis estadístico de la relación p-S6K/S6K. Se muestra la media \pm DE (n = 3). ANOVA de 1 vía, prueba post-hoc tukey $p < 0.05$. Letras diferentes indican diferencia significativa entre los tratamientos.

7.10 La activación de la proteína SnRK1 juega un papel importante durante la tolerancia al estrés por ERO ante la exposición a la piocianina en plántulas Col-0, *kin10* y *raptor1b* en *A. thaliana*

Finalmente se evaluó el fenotipo de las plántulas de las tres líneas Col-0, *kin10* y *raptor 1b* y utilizamos los inhibidores de las proteínas TOR y SnRK1 para tener un mejor panorama del papel que juegan estas proteínas durante la exposición a factores de virulencia como la piocianina. En la figura 15 se muestran las plántulas transcurridos 7 días post-tratamiento. Se observa una inhibición del crecimiento de la raíz principal en las plántulas tratadas con AZD, así como una disminución en el peso fresco, un efecto característico de los inhibidores de la proteína TOR. Mientras que, la dorsomorfina no muestra un efecto sobre el crecimiento de las plántulas del ecotipo Col-0, pero sí una ligera disminución del crecimiento de la raíz principal y el peso fresco en las líneas mutantes *kin10* y *raptor1b*. Interesantemente observamos que en la combinación de los tratamientos AZD más piocianina las plántulas de las tres líneas el follaje se ve más verde y el peso fresco aumenta significativamente con respecto al tratamiento con AZD, lo cual posiblemente esté relacionado con la modulación del estado redox que produce la piocianina en la punta de la raíz.

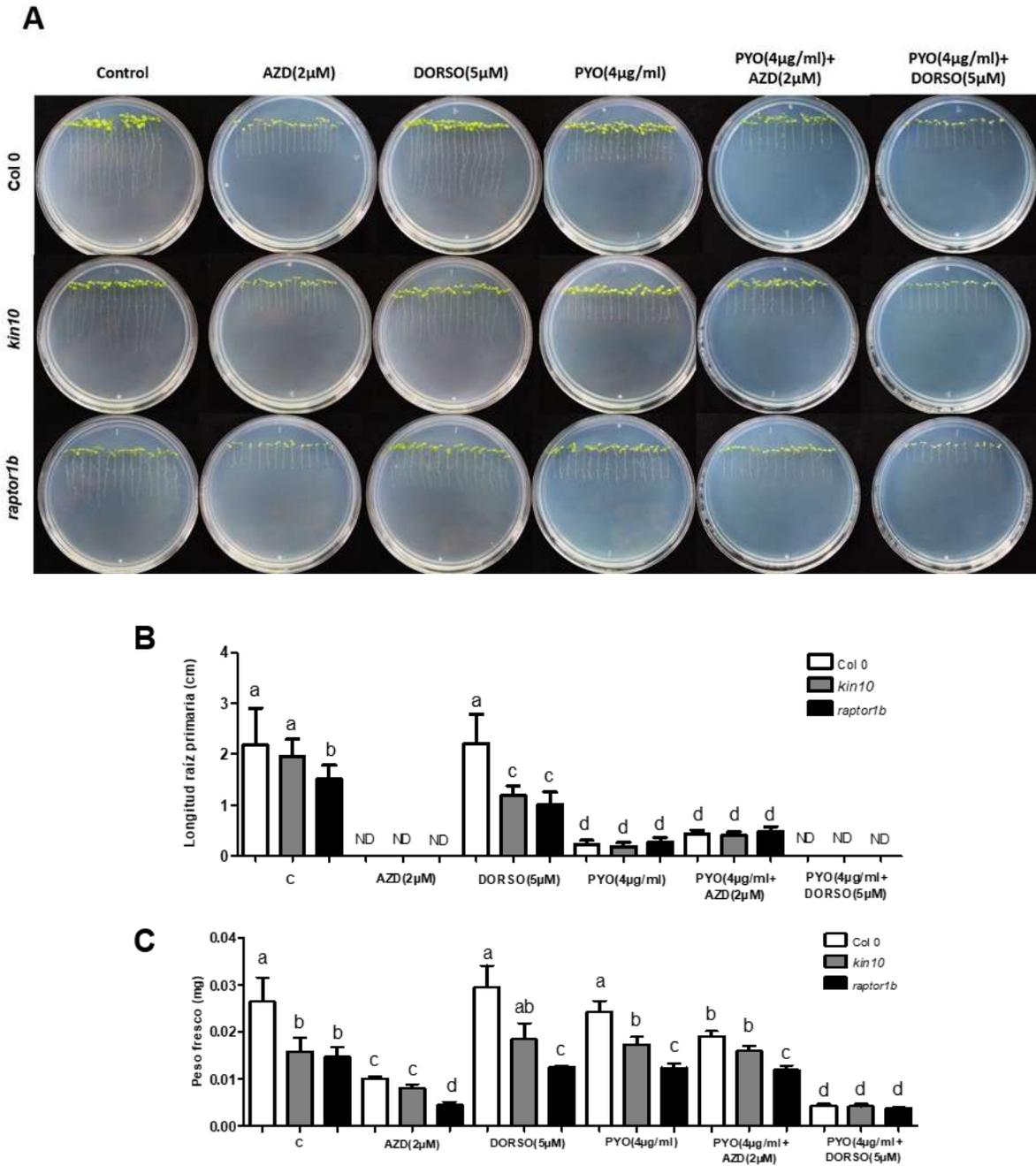


Figura 15. Evaluación del crecimiento y desarrollo ante la inhibición de la proteína SnRK1 durante la tolerancia al estrés por ERO en plántulas Col-0, kin10 y raptor1b en *A. thaliana*. A) Fotografías representativas de los tratamientos con piocianina y los inhibidores de las proteínas cinasas TOR y SnRK1 a los 7 días de tratamiento. **B, C)** Análisis estadístico de la longitud de la raíz y el peso fresco. Se muestra la media \pm DE (n = 10) de al menos 3 réplicas. ANOVA de 1 vía, prueba post-hoc Tukey, $p < 0.05$. Letras diferentes indican diferencia significativa entre los tratamientos.

Por último, observamos que la combinación de los tratamientos dorsomorfina más piocianina inhibe completamente el crecimiento de la raíz principal y disminuye el

peso fresco en comparación con el control, incluso es ligeramente más bajo que el tratamiento con AZD. Estos resultados dejan un poco más claro el papel de la proteína SnRK1, ya que al inhibirla y agregar la piocianina al medio, la planta deja de crecer, no es capaz de tolerar el estrés oxidativo que ocasiona esta última, vemos una fuerte inducción de la autofagia en la combinación de estos tratamientos, como una posible respuesta para sobrellevar el estrés, sin embargo, la proteína SnRK1 regula la expresión de un gran número de genes de tolerancia al estrés, por lo que es indispensable que responda de manera adecuada para mediar el ajuste el crecimiento y desarrollo.

8. Discusión y conclusiones

La piocianina es un importante factor de virulencia secretado por *Pseudomonas aeruginosa*, que puede atravesar fácilmente las membranas biológicas (Rashid *et al.*, 2020) y al igual que los ramnolípidos, están involucrados en el desarrollo normal de biopelículas por lo que juegan un papel muy importante en la persistencia de las infecciones (Davey *et al.*, 2003; Zeng *et al.*, 2020). En este estudio se evaluó el efecto que tienen estas moléculas sobre la actividad de los reguladores metabólicos TOR y SnRK1 en plantas, para lo cual se monitoreo la actividad de TOR a través de uno de sus sustratos, la cinasa de la proteína ribosómica S6 (S6K). El tratamiento con los RL (40µg/ml), no mostro un efecto en los niveles de fosforilación de S6K entre las 6-12 horas de tratamiento, sin embargo, no descartamos que en algún punto durante los primero minutos u horas haya alguna interacción con estas vías de señalización, ya que los RL indujeron la formación de raíces adventicias en las líneas Col-0 y *kin10*, pero no en *raptor1b*, lo que parece indicar que la actividad de la proteína TOR es necesario para la señalización desencadenada por RL, donde hay inhibición de la raíz principal y surgimiento de raíces adventicias, ya que se ha reportado que la inhibición de la proteína TOR en la raíz primaria origina raíces adventicias (Deng *et al.*, 2017).

Por otro lado, el tratamiento con la PYO (4µg/ml) si disminuyo los niveles de fosforilación en S6K a las 8 horas de tratamiento, lo cual indica que la PYO está influyendo en la regulación del crecimiento a través de la regulación negativa de la

vía de señalización de la proteína TOR. La cinasa SnRK1 actúa como un sensor de energía y se activa en condiciones de baja energía o estrés metabólico para inhibir el crecimiento y conservar la energía, de tal forma que, actúa de manera antagónica al complejo TOR (figura 16, A) (Rodríguez *et al.*, 2019). Durante este estudio, se observó que el tratamiento con la PYO incremento los niveles intracelulares de ERO, particularmente anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en las puntas de las raíces, provocando un desbalance redox (Hall *et al.*, 2016). Para controlar los niveles de ERO, las plantas dependen de sistemas antioxidantes específicos enzimático y no enzimáticos (Hasanuzzaman *et al.*, 2020). Sin embargo, cuando hay organelos dañados por el exceso de ERO, la autofagia puede promover la degradación de estos. Por lo tanto, la autofagia puede considerarse como un sistema antioxidante no canónico que actúa sobre biomoléculas u orgánulos en lugar de moléculas de bajo peso molecular (Signorelli *et al.*, 2019). La PYO induce la activación de la autofagia en algunas células de mamíferos de manera dependiente de la dosis y el tiempo (Du *et al.*, 2021). Aquí se observó que la PYO también es capaz de inducir la activación de la autofagia en plantas para mantener la homeostasis celular. Este proceso se encuentra fuertemente regulado por las proteínas cinasas TOR y SnRK1. En este estudio se utilizó la línea mutante *kin10*, para evaluar el papel de la proteína SnRK1. No obstante, a lo largo del estudio no se observaron diferencias fenotípicas o fisiológicas evidentes, más bien la mutante *kin10* parecía responder muy similar al ecotipo Col-0. Se ha informado que la actividad de KIN10 tiene el potencial de ser modulada por redox *in vivo* (Wurzinger *et al.*, 2017) no obstante, no se observó mayor susceptibilidad en la mutante *kin10* durante la exposición a la PYO, una posibilidad que se considera es que la segunda isoforma de la subunidad catalítica de SnRK1, KIN11, podría estar sustituyendo a KIN10, ya que se ha reportado que, aunque cada proteína tiene funciones específicas un doble mutante (*kin10/kin11*) es letal, lo que sugiere cierto grado de redundancia funcional. (Soto-Burgos y Bassham, 2017).

Establecimos también un tratamiento con dorsomorfina, un inhibidor farmacológico de AMPK (SnRK1). Este compuesto, induce autofagia en células de mamíferos. Observamos que en plantas también es capaz de inducir autofagia, probablemente

por un mecanismo distinto al que lo hace en células de mamífero. Cuando combinamos este inhibidor con la piocianina se indujo un incremento superior en la formación de autofagosomas, sin embargo, no se sabe con exactitud cuál es el mecanismo. La piocianina origina una sobre producción de ERO que necesita ser eliminada, sin embargo, al estar bloqueada la actividad de SnRK1 no hay una regulación en la modulación de estas, por lo que se acumulan (figura 16, B). Una alternativa para explicar el incremento en el número de fagosomas es que el exceso de ERO está estimulando directamente la expresión de los genes atg y la formación de autofagosomas como sucede en otros tipos de estrés (Zhang *et al.*, 2021).

La punta de las raíces es una zona de producción activa de ERO. El $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 tienen zonas de acumulación y funciones distintas. El peróxido de hidrógeno se ubica en la zona de diferenciación y está involucrado en la restricción del crecimiento y la formación de pelo radicular, mientras que el $O_2^{\cdot-}$ parece ser necesario para la elongación de la raíz (Dunand *et al.*, 2017). Por lo tanto, es indispensable que se mantenga el equilibrio para el correcto el crecimiento y desarrollo de la raíz. El AZD es un inhibidor ATP-competitivo, que inhibe a la proteína TOR, y con ello el crecimiento de la planta. En este estudio se observó, particularmente, que el tratamiento con AZD disminuye los niveles de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 en la punta de la raíz. Curiosamente, al combinar este inhibidor con el tratamiento con la piocianina la señalización de ERO incrementaba a un nivel muy similar al del control y 7 días después del tratamiento se observó, un incremento en el peso fresco de las plantas en comparación con el tratamiento solo con AZD. Resultados similares informaron Torres-Olmos *et al.* (2022) quienes observaron que al inhibir la actividad TOR por AZD-8055, la expresión de ciclina y expansina, un marcador de diferenciación celular aumentó fuertemente a una concentración de H_2O_2 de 0.5 mM.

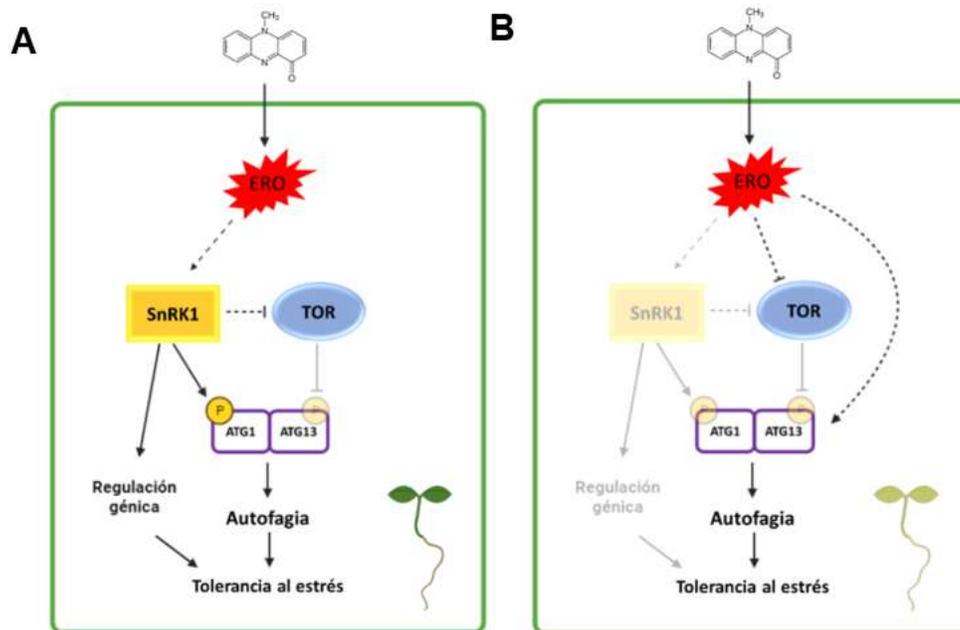


Figura 16. Modelo propuesto de la participación de la proteína SnRK1 durante la tolerancia al estrés por ERO ante la exposición a la piocianina en *A. thaliana*. **A)** En respuesta a la generación de especies reactivas que induce la piocianina en la planta, la proteína SnRK1 regula a la baja la actividad de TOR, y a su vez SnRK1 induce la activación de procesos catabólicos como la autofagia para mantener la homeostasis celular y la tolerancia al estrés el estrés. **B)** Las especies reactivas de oxígeno, se acumulan tras inhibición de la proteína SnRK1, quien regula la tolerancia estrés. Hay una inducción fuerte en la activación de la autofagia, probablemente a través de la inhibición de TOR o sobre la activación directa por ERO, sobre la autofagia, la cual como se induce como un mecanismo para la eliminación de ERO que más tarde se vuelve contraproducente y repercute en el crecimiento de la planta.

En este estudio también se usó la mutante en *rpto1b*, esta mutación causa un retraso evidente del crecimiento de la planta, disminución en la actividad de la cinasa de la proteína ribosómica S6 y en la producción de especies reactivas de oxígeno alta que puede estar ligada a la inducción de la autofagia (Salem *et al.*, 2018). Durante los tratamientos con la PYO y los inhibidores de las proteínas TOR y SnRK1 se observó un incremento en los niveles de $O_2^{\cdot-}$. Un incremento en la producción de ERO tiene correlación directamente con un aumento significativo en la inducción de la autofagia. Se sugiere que este mecanismo puede dar como resultado un aumento de los recursos y un aumento en la capacidad para tolerar el estrés (Marash *et al.*, 2022), sin embargo, a periodos de tiempo tan cortos, parece no ser evidente, se necesita de un tiempo de tratamiento mayor para evaluar lo

antes mencionado. Con todo lo anterior se concluye que la piocianina producida por *P. aeruginosa* regula el crecimiento y el desarrollo en *Arabidopsis thaliana* a través de la activación a la proteína SnRK1 y la regulación negativa en la actividad de la proteína TOR.

9. Literatura citada

Abdel-Mawgoud A.M, Lépine F, Déziel E, (2010). Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl Microbiol Biotechnol*, 86(5):1323-36.

Ahn C.S, Ahn H.K, Pai H.S, (2015). Overexpression of the PP2A regulatory subunit Tap46 leads to enhanced plant growth through stimulation of the TOR signalling pathway. *J Exp Bot*, (66) 827–840.

Ahn C.S, 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. *The Plant Cell*, (23):185–209.

Alfiniyah C, y Bees M.A, Wood A.J, (2019). Quorum machinery: Effect of the las system in rhl regulation of *P. aeruginosa*. *AIP Conference Proceedings. An Acad Bras Cienc*, 2192(1): 060001.

Anantharajah A, Mingeot-Leclercq M.P, Van Bambeke F, (2016). Targeting the Type Three Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa*. *Trends Pharmacol Sci*, 37(9):734-749.

Anderson GH, Veit B, Hanson MR, (2005) The *Arabidopsis* AtRaptor genes are essential for post-embryonic plant growth, *BMC Biology*, 21(3):12.

Apel K, y Hirt H, (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 55:373-99.

Aylett C.H, Sauer E, Imseng S, Boehringer D, Hall M.N, Ban N, Maier T, (2016). Architecture of human mTOR complex 1. *Science*. 351(6268):48-52.

Aznar N.R, Consolo V.F, Salerno G.L, Martínez-Noël G.M.A, (2018). TOR signaling downregulation increases resistance to the cereal killer *Fusarium graminearum*. *Plant Signal Behav.*, 13(2): e1414120.

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 J.M, Sheen J.A, (2007). Central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature*, 448(7156):938-42.

Baena-González E, y Sheen J. (2008). Convergent energy and stress signaling. *Trends Plant Sci*, 13(9):474-82.

Bhar A, Chakraborty A, Roy A, (2022). Plant Responses to Biotic Stress: Old Memories Matter. *Plants*,11(1):84.

Bigeard J, Colcombet J, Hirt H, (2015). Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Mol Plant*, 8(4):521-39.

Bleves S, Viarre V, Salacha R, Michel G.P.F, Filloux A, Voulhoux R, (2010). Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: a wealth of pathogenic weapons. *Int J Med Microbiol*, 300(8), 534–543.

Burrows L.L, (2012). *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. *Ann Rev Microbiol*, 66:493-520.

Cao H, Krishnan G, Goumnerov B, Tsongalis J, Tompkins R, Rahme L.G, (2001). A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. *PNAS*, 98(25):14613-8.

Chen L, Zou Y, She P, Wu Y, (2015). Composition, function, and regulation of T6SS in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Res*, 172:19-25.

Choi Y, Park H.Y, Park S.J, Park S.J, Kim S.K, Ha C, Im S.J, Lee J.H, (2011). Growth phase-differential quorum sensing regulation of anthranilate metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Cells*, 32(1):57-65.

Choudhary A, Kumar A, Kaur N, (2020). ROS and oxidative burst: Roots in plant development. *Plant divers*, 42(1): 33-43.

Chrzanowski Ł, Ławniczak Ł, Czaczyk K, (2012). Why do microorganisms produce rhamnolipids? *World J Microbiol Biotechnol*, 28(2):401-19.

Cornelis P, Dingemans J, (2013) *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Front cell Infect Microbiol*, (3):75.

Dangl JL, Jones JDG, (2001). Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature*, 411:826–33.

Dauner M. y Skerra A, (2020). Scavenging Bacterial Siderophores with Engineered Lipocalin Proteins as an Alternative Antimicrobial Strategy. *Chembiochem*, 21(5):601-606.

Davey M.E, Caiazza N.C, O'Toole G.A, (2003). Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*, 185(3):1027-36.

De La Calle Rodríguez N, Santa V.C, Cardona C.N, (2012). Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. *CES Medicina*, 26(1): 43-55.

De Lorenzo G, Ferrari S, Cervone F, Okun E, (2018). Extracellular DAMPs in Plants and Mammals: Immunity, Tissue Damage and Repair. *Trends in Immunol*, 39(11):937-950.

De Vleeschauwer D, Filipe O, Hoffman G, Seifi HS, Haeck A, Canlas P, Van Bockhaven J, De Waele E, Demeestere K, Ronald P, Hofte M, (2018). Target of rapamycin signaling orchestrates growth-defense trade-offs in plants. *New Phytologist*, 217(1):305-319.

Deng K, Dong P, Wang W, Feng L, Xiong F, Wang K, Zhang S, Feng S, Wang B, Zhang J, Ren M, (2017). The TOR Pathway Is Involved in Adventitious Root Formation in *Arabidopsis* and Potato. *Front Plant Sci*, 12;8:784.

Diaz-Troya S, Florencio F.J, Crespo J.L, (2008). Target of rapamycin and LST8 proteins associate with membranes from the endoplasmic reticulum in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell*, 7(2):212-22.

Dobrenel T, Caldana C, Hanson J, Robaglia C, Vincentz M, Veit B, Meyer C, (2016). TOR signaling and nutrient sensing. *Ann Rev Plant Biol*, 29(67):261-85.

Dröge-Laser W, y Weiste C, (2018). The C/S1 bZIP Network: A Regulatory Hub Orchestrating Plant Energy Homeostasis. *Trends Plant Sci*, 23(5):422-433.

Du Y, Guo H, Guo L, Miao J, Ren H, Liu K, Ren L, He J, Wang X, Chen J, Li J, Wang Y, Wang J, Huang N (2021). The regulatory effect of acetylation of HMGN2 and H3K27 on pyocyanin-induced autophagy in macrophages by affecting Ulk1 transcription. *J Cell Mol Med*, 25(15):7524-7537.

Dunand C, Crèvecoeur M, Penel C, (2007). Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. *New Phytol*, 174(2):332-341.

Edel K.H, y Kudla J, (2015). Increasing complexity and versatility: how the calcium signaling toolkit was shaped during plant land colonization. *Cell Calcium*, 57(3):231-46.

Enganti R, Cho S.K, Toperzer J.D, Urquidi-Camacho R.A, Cakir O.S, Ray A.P, Abraham P.E, Hettich R.L, von Arnim A.G, (2018.) Phosphorylation of Ribosomal Protein RPS6 Integrates Light Signals and Circadian Clock Signals. *Front Plant Sci*, 19(8):2210.

Fong J.N.C, y Yildiz F.H, (2015). Biofilm matrix proteins. *Microbiol Spectr*, 3(2):10.1128.

Fonseca B.D, Smith E.M, Yelle N, Alain T, Bushell M, Pause A, (2014). The ever-evolving role of mTOR in translation. *Semin Cell Dev Biol*, 36:102-12.

Foyer C.H, Noctor G, (2005). Oxidant and antioxidant signaling in plants: A re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ*. 29:1056–1071.

Fragoso S, Espíndola L, Páez-Valencia J, Gamboa A, Camacho Y, Martínez-Barajas E, Coello P, (2009). SnRK1 isoforms AKIN10 and AKIN11 are differentially regulated in *Arabidopsis* plants under phosphate starvation. *Plant Physiol*, 149(4):1906-16.

Fu L, Wang P, Xiong Y. (2020). Target of Rapamycin Signaling in Plant Stress Responses. *Plant Physiol*, 182(4):1613-1623.

Gao X.Q, Liu C.Z, Li D.D, Zhao T.T, Li F, Jia X.N, Zhao X.Y, Zhang X.S, (2016). The *Arabidopsis* KIN β subunit of the SnRK1 complex regulates pollen hydration on the stigma by mediating the level of reactive oxygen species in pollen. *PLoS Genetics* 12(7): e1006228.

García-Reyes S, Soberón-Chávez G, Cocotl-Yanez M, (2020). The third quorum-sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*: *Pseudomonas* quinolone signal and the enigmatic PqsE protein. *J Med Microbiol*, 69(1), 25–34

Gellatly S.L, y Hancock R.E, (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog. Dis*, 67:159–173.

Ghafoor A, Hay I.D, Rehm B.H, (2011). Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Appl Environ Microbiol*, 77(15):5238-46.

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(21):3978–90.

Gutiérrez Venegas G, (2010). Comunicación celular. *ROM*, 14(3), 142-144.

Gwinn D.M, Shackelford D.B, Egan D.F, Mihaylova M.M, Mery A, Vasquez D.S, Turk B.E, Shaw R.J (2008). AMPK phosphorylation of RAPTOR mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*, 30(2):214-26.

Hafren A, Macia JL, Love AJ, Milner JJ, Drucker M, Hofius D, (2017). Selective autophagy limits cauliflower mosaic virus infection by NBR1-mediated targeting of viral capsid protein and particles. *PNAS*, 114:2026–35 52.

Hafren A, üstün S, Hochmuth A, Svenning S, Johansen T, Hofius D, (2018). Turnip mosaic virus counteracts selective autophagy of the viral silencing suppressor HCpro. *Plant Physiol*. 176:649–62

Haiko J, y Westerlund-Wikström B, (2013). The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology (Basel)*, 2(4):1242-67.

Halford N.G, y Hey S.J, (2009). Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochem J*, 419: 247–259.

Hall S, McDermott C, Anoopkumar-Dukie S, McFarland A.J, Forbes A, Perkins A.V, Davey A.K, Chess-Williams R, Kiefel M.J, Arora D, (2016). Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins*, 8(8): 236.

Hao L, Wang H, Sunter G, Bisaro D.M, (2003). Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with and inactivate SNF1 kinase. *Plant Cell*,15(4):1034-48.

Hasanuzzaman M, Bhuyan MHMB, Parvin K, Bhuiyan TF, Anee TI, Nahar K, Hossen MS, Zulficar F, Alam MM, Fujita M, (2020). Regulation of ROS Metabolism in Plants under Environmental Stress: A Review of Recent Experimental Evidence. *Int J Mol Sci*, 18;21(22):8695.

Hauser A.R, (2009). The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol*, 7(9):654-65.

Haxim Y, Ismayil A, Jia Q, Wang Y, Zheng X, Chen T, Qian L, Liu N, Wang Y, Han S, Cheng J, Qi Y, Hong Y, Liu Y, (2017). Autophagy functions as an antiviral mechanism against geminiviruses in plants. *Elife*. 6: e23897.

Hinsa S.M, O'Toole G.A, (2004). Mechanisms of adhesion by *Pseudomonas*. *Pseudomonas*, pp 699–720.

Hofius D, Li L, Hafrén A, Coll NS, (2017). Autophagy as an emerging arena for plant-pathogen interactions. *Curr Opin Plant Biol*, 38:117-123.

Hossain M.A, Bhattacharjee S, Armin S.M, Qian P, Xin W, Li H.Y, Burritt D.J, Fujita M, Tran L.S, (2015). Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging. *Front Plant Sci*. 16(6):420.

Huang X, Zheng C, Liu F, Yang C, Zheng P, Lu X, Tian J, Chung T, Otegui MS, Xiao S, Gao C, Vierstra R.D, Li F, (2019). Genetic Analyses of the *Arabidopsis* ATG1 Kinase Complex Reveal Both Kinase-Dependent and Independent Autophagic Routes during Fixed-Carbon Starvation. *Plant Cell*, 31(12):2973-2995.

Imran Q.M, Falak N, Hussain A, Mun B.G, Yun B.W, (2021). "Abiotic Stress in Plants; Stress Perception to Molecular Response and Role of Biotechnological Tools in Stress Resistance". *Agronomy* 11, no. 8: 1579.

Ingargiola C, Turqueto Duarte G, Robaglia C, Leprince A.S, Meyer C, (2020). The Plant Target of Rapamycin: A Conduc TOR of Nutrition and Metabolism in Photosynthetic Organisms. *Genes (Basel)*, 11(11):1285

Jacobsen T, Bardiaux B, Francetic O, Izadi-Pruneyre N, Nilges M, (2020). Structure and function of minor pilins of type IV pili. *Med Microbiol Immunol*, 209(3):301-308.

Jamsheer K.M, Jindal S, Laxmi A, (2019). Evolution of TOR–SnRK dynamics in green plants and its integration with phytohormone signaling networks. *J Exp Bot*, 69(1):100-112.e6.

Jeong E.Y, Seo P.J, Woo J.C, Park C.M, (2015). AKIN10 delays flowering by inactivating IDD8 transcription factor through protein phosphorylation in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol*, (15): 110.

Jones J.D, y Dangl J.L, (2006) The plant immune system. *Nature*. 444(7117):323-9.

Jossier M, Bouly J.P, Meimoun P, Arjmand A, Lessard P, Hawley S, Grahame Hardie D, Thomas M, (2009). SnRK1 (SNF1-related kinase 1) has a central role in sugar and ABA signalling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 59(2):316–28.

Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S, (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *Int J Mol Sci*, 22(6):3128.

Jyot J, y Ramphal R, (2008). Flagella and pili of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas: Model Organism, Pathogen*. Cell Factory, pp 85–108.

Kahlon R.S, (2016). *Pseudomonas*: molecular and applied biology. *Pseudomonas: Molecular and Applied Biology*. Springer, pp1–518.

Kariminik A, Baseri-Salehi M, Kheirkhah B, (2017). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing modulates immune responses: An updated review article. *Immunol Lett*. 190:1-6.

Khan M, Jannat A, Munir F, Nosheen F, Ami R, (2020). Biochemical and Molecular Mechanisms of Abiotic Stress Tolerance. Ed. Springer: *Singapur*, ISBN, 978-981-15-2171-3.

Khodayary R, Nikokar I, Mobayen M.R, (2019). High incidence of type III secretion system associated virulence factors (exoenzymes) in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian burn patients. *BMC Res Notes*,12(1):28.

Kleinow T, Bhalerao R, Breuer F, Umeda M, Salchert K, Koncz C, (2000). Functional identification of an *Arabidopsis* snf4 ortholog by screening for heterologous multicopy suppressors of snf4 deficiency in yeast. *The Plant Journal*, 23(1):115-22.

Klemm P, Hancock V, Schembri M.A, (2010) Fimbrial adhesins from extraintestinal *Escherichia coli*. *Environ Microbiol Rep*, 2(5):628-40.

Kolukisaoglu U, Weini S, Blazevic D, Batistic O, Kudla J, (2004). Calcium sensors and their interacting protein kinases: Genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks. *Plant Physiol*, (134): 43–5.

Kostylev M, Kim D.Y, Smalley NE, Salukhe I, Peter Greenberg E, Dandekar AA. (2019). Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing hierarchy. *Proc. Natl Acad Sci*, 116(14), 7027–7032.

Kourelis J, y Van der Hoorn R.A.L, (2018). Defended to the Nines: 25 Years of Resistance Gene Cloning Identifies Nine Mechanisms for R Protein Function. *Plant Cell*, 30(2):285-299.

Kravchenko A, Citerne S, Jéhanno I, Bersimbaev R.I, Veit B, Meyer C, Leprince A.S, (2015). Mutations in the *Arabidopsis* *Lst8* and *Raptor* genes encoding partners of

the TOR complex, or inhibition of TOR activity decrease abscisic acid (ABA) synthesis. *BBRC*, 467(4):992-7.

Kulik A, Wawer I, Krzywińska E, Bucholc M, Dobrowolska G, (2011). SnRK2 protein kinases-key regulators of plant response to abiotic stresses. *OMICS*, (15): 859-872.

Lamers J, van der Meer T, Testerink C, (2020). How Plants Sense and Respond to Stressful Environments. *Plant Physiology*, 182(4); 1624–1635.

Lau G.W, Hassett D.J, Ran H, Kong F, (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med*, 10(12):599-606.

Lee D.H, Park S.J, Ahn C.S, Pai H.S, (2017). MRF Family Genes Are Involved in Translation Control, especially under Energy-Deficient Conditions, and Their Expression and Functions Are Modulated by the TOR Signaling Pathway. *Plant Cell*, 29(11):2895-2920.

Lee J, Wu J, Deng Y, Wang J, Wang C, Wang J, Chang C, Dong Y, Williams P, Zhang L.H, (2013). A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nat chem biol*, 9(5), 339–343.

Lee J, y Zhang L, (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell*, 6(1):26-41.

Leid J.G, Willson C.J, Shirliff M.E, Hassett D.J, Parsek M.R, Jeffers A.K, (2005). The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing. *J Immunol*, 175(11):7512-8.

Li X.F, Li Y.J, An Y.H, Xiong L.J, Shao X.H, Wang Y, Sun Y, (2009). AKINbeta1 is involved in the regulation of nitrogen metabolism and sugar signaling in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol*, 51(5):513-20.

Liu Y, Bassham DC, (2012). Autophagy: pathways for self-eating in plant cells. *Annu Rev Plant Biol*, 63:215-37.

Liu Y, Schiff M, Czymbek K, Talloczy Z, Levine B, Dinesh-Kumar SP, (2005). Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell*, 121:567–77.

Liu Y, Xiong Y, Bassham DC, (2009). Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. *Autophagy*. 5(7):954-63.

Liu Y, y Xiong Y, (2022). Plant target of rapamycin signaling network: Complexes, conservations, and specificities. *J Integr Plant Biol*, 64(2):342-370.

Lixa C, Mujo A, Anobom C.D, Pinheiro A.S, (2015). A structural perspective on the mechanisms of quorum sensing activation in bacteria. *An Acad Bras Cienc*, 87(4): 2189-2203.

Lumbreras V, Alba M.M, Kleinow T, Koncz C, Pagés M. (2001). Domain fusion between SNF1-related kinase subunits during plant evolution. *EMBO Reports*, 2(1):55-60.

Lyzenga W.J, Liu H, Schofield A, Muise-Hennessey A, Stone S.L, (2013). *Arabidopsis* CIPK26 interacts with KEG, components of the ABA signaling network and is degraded by the ubiquitin-proteasome system. *J Exp Bot*, 64(10):2779-91.

Magen S, Seybold H, Laloum D, Avin-Wittenberg T, (2022). Metabolism and autophagy in plants-a perfect match. *FEBS Lett*. 596(17):2133-2151.

Mair A, Pedrotti L, Wurzinger B, Anrather D, Simeunovic A, Weiste C, Valerio C, Dietrich K, Kirchler T, Nägele T, Vicente Carbajosa J, Hanson J, Baena-González E, Chaban C, Weckwerth W, Dröge-Laser W, Teige M, (2015). SnRK1-triggered switch of bZIP63 dimerization mediates the low-energy response in plants. *Elife*, 11;4: e05828.

Maizel A, (2023). TOR acts as a metabolic gatekeeper for auxin-dependent lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J*, 15;42(10): e111273.

Manik S.M, Shi S, Mao J, Dong L, Su Y, Wang Q, Liu H, (2015) The calcium sensor CBL-CIPK is involved in plant's response to abiotic stresses. *Int J Genomics*, 2015:493191.

- Mann E.E, y Wozniak D.J, (2012) *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol Rev*, 36(4):893-916.
- Marash I, Leibman-Markus M, Gupta R, Avni A, Bar M, (2022). TOR inhibition primes immunity and pathogen resistance in tomato in a salicylic acid-dependent manner. *Mol Plant Pathol*, 23(7):1035-1047.
- Margalha L, Confraria A, Baena-González E, (2019). SnRK1 and TOR: modulating growth-defense trade-offs in plant stress responses. *J Exp Bot*, 70(8):2261-2274.
- Marshall RS, Vierstra RD, (2018). Autophagy: The Master of Bulk and Selective Recycling. *Annu Rev Plant Biol*. 69:173-208.
- McCready K, Spencer V, Kim M, (2020). The Importance of TOR Kinase in Plant Development. *Front Plant Sci*. 5(11):16.
- McKnight S.L, Iglewski B.H, Pesci E.C, (2000).The *Pseudomonas* Quinolone Signal Regulates rhl Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 182:2702–2708.
- Meteignier L.V, El Oirdi M, Cohen M, Barff T, Matteau D, Lucier J.F, Rodrigue S, Jacques P.E, Yoshioka K, Moffett P, (2017). Translatome analysis of an NB-LRR immune response identifies important contributors to plant immunity in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 68(9):2333-2344.
- Meuskens I, Saragliadis A, Leo J.C, Linke D, (2019). Type V secretion systems: an overview of passenger domain functions. *Front. Microbiol*. (10):1163.
- Meyuhas O, y Kahan T, (2015). The race to decipher the top secrets of TOP mRNAs. *Biochim Biophys Acta*, 1849(7):801-11.
- Minibayeva F, Dmitrieva S, Ponomareva A, Ryabovol V, (2012). Oxidative stress-induced autophagy in plants: the role of mitochondria. *Plant Physiol Biochem*, 59:11-9.
- Mittler R, (2017) ROS Are Good. *Trends Plant Sci*, 22(1):11-19.

Moreau M, Azzopardi M, Clément G, Dobrenel T, Marchive C, Renne C, Martin-Magniette M.L, Taconnat L, Renou J.P, Robaglia C, Meyer C, (2012). Mutations in the *Arabidopsis* homolog of LST8/GβL, a partner of the target of Rapamycin kinase, impair plant growth, flowering, and metabolic adaptation to long days. *Plant Cell*, 24(2):463-81.

Mugume Y, Kazibwe Z, Bassham D.C, (2020). Target of Rapamycin in Control of Autophagy: Puppet Master and Signal Integrator. *Int J Mol Sci*, 21(21):8259.

Murray T.S, y Kazmierczak B.I, (2008). *Pseudomonas aeruginosa* exhibits sliding motility in the absence of type IV pili and flagella. *J. Bacteriol*, 190:2700–2708.

Nickzad A, y Déziel E, (2014). The involvement of rhamnolipids in microbial cell adhesion and biofilm development-An approach for control? *Lett Appl Microbiol*, 58(5):447-53.

Nishad R, Ahmed T, Rahman V.J, Kareem A, (2020). Modulation of Plant Defense System in Response to Microbial Interactions. *Front Microbiol*, 3(11):1298.

Noctor G, Reichheld JP, Foyer CH, (2018). ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Semin Cell Dev Biol*, 80:3-12.

Nukarinen E., Nägele T., Pedrotti L., Wurzinger B., Mair A., Landgraf R., Börnke F., Hanson J., Teige M., Baena-Gonzalez E, Dröge-Laser W, Weckwerth W, (2016). Quantitative phosphoproteomics reveals the role of the AMPK plant ortholog SnRK1 as a metabolic master regulator under energy deprivation. *Sci Rep*, (6):31697.

Paes de Melo B, Carpinetti, PdA, Fraga AT, Rodrigues-Silva PL, Fioresi VS, de Camargos LF, Ferreira, MFdS, (2022). Abiotic Stresses in Plants and Their Markers: A Practice View of Plant Stress Responses and Programmed Cell Death Mechanisms. *Plants*,11(9): 1100.

Patel S, Dinesh-Kumar SP, (2008). *Arabidopsis* ATG6 is required to limit the pathogen-associated cell death response. *Autophagy*, 4(1):20-7.

Paz-Zarza VM, Mangwani M.S, Martínez M.A, Álvarez H.D, Solano-Gálvez S.G, Vázquez-López R, (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Rev Chilena Infectol*, 36 (2): 180-189.

Rada B, y Leto TL., (2013). Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections. *Trends Microbiol*, 21(2): 73-81.

Ramel F, Sulmon C, Gouesbet G, Couée I, (2009). Natural variation reveals relationships between pre-stress carbohydrate nutritional status and subsequent responses to xenobiotic and oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot*, 104:1323-1337.

Ramon M, Ruelens P, Li Y, Sheen J, Geuten K, Rolland F, (2013). The hybrid four-CBS-domain KIN β subunit functions as the canonical γ subunit of the plant energy sensor SnRK1. *The Plant Journal*, 75(1):11-25.

Rashid MI, Andleeb S, Ali A, (2020). Evaluation of Pyocyanin induced systemic pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pak J Pharm Sci*, 33(3):915-922.

Robaglia C, Thomas M, Meyer C, (2012). Sensing nutrient and energy status by SnRK1 and TOR kinases. *Curr Opin Plant Biol*, 15(3):301-7.

Rocha C.L, Coburn J, Rucks E.A, Olson J.C, (2003). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S as a bifunctional enzyme in J774A.1 macrophages. *Infect. Immun.* 71(9), 5296–5305.

Rodriguez M, Parola R, Andreola S, Pereyra C, Martínez-Noël G, (2019). TOR and SnRK1 signaling pathways in plant response to abiotic stresses: ¿Do they always act according to the “yin-yang” model? *Plant Sci*, (288):110220.

Rollet C, Gal L, Guzzo J, (2009). Biofilm-Detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: A Comparative Study of Adhesion and Physiological Characteristics in *Pseudomonas Aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*, 290, (2):135–142.

Rosenberger C.L, y Chen J, (2018). To grow or not to grow: TOR and SnRK2 coordinate growth and stress response in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* (69): 3–4.

Salem M.A, Li Y, Bajdzienko K, Fisahn J, Watanabe M, Hoefgen R, Schöttler M.A, Giavalisco P, (2018). RAPTOR Controls Developmental Growth Transitions by Altering the Hormonal and Metabolic Balance. *Plant Physiol.* 177(2):565-593.

Sana T.G, Berni B, Bleves S, (2016). The T6SSs of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1 and Their Effectors: Beyond Bacterial-Cell Targeting. *Front Cell Infect Microbiol.* (6):61.

Sanchez L, Courteaux B, Hubert J, Kauffmann S, Renault J.H, Clément C, Baillieul F, Dorey S, (2012). Rhamnolipids elicit defense responses and induce disease resistance against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic pathogens that require different signaling pathways in *Arabidopsis* and highlight a central role for salicylic acid. *Plant Physiol*,160(3):1630-41.

Sanzón G.D, y Zavaleta M.E, (2011). Respuesta de hipersensibilidad, una muerte celular programada para defenderse del ataque por fitopatógenos. *Rev mex fitopatol*, 29(2): 154-164.

Saxton R.A, y Sabatini D.M, (2017). mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell*, 168(6):960-976.

Scarpin M.R, Leiboff S, Brunkard J.O, (2020). Parallel global profiling of plant TOR dynamics reveals a conserved role for LARP1 in translation. *Elife*, 15;9: e58795.

Schellenberger R, Crouzet J, Nickzad A, Shu L.J, Kutschera A, Gerster T, Borie N, Dawid C, Cloutier M, Villaume S, Dhondt-Cordelier S, Hubert J, Cordelier S, Mazeyrat-Gourbeyre F, Schmid C, Ongena M, Renault J.H, Haudrechy A, Hofmann T, Baillieul F, Clément C, Zipfel C, Gauthier C, Déziel E, Ranf S, Dorey S, (2021). Bacterial rhamnolipids and their 3-hydroxyalkanoate precursors activate *Arabidopsis* innate immunity through two independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci*, 118(39): e2101366118.

Schepetilnikov M, Kobayashi K, Geldreich A, Caranta C, Robaglia C, Keller M, Ryabova L.A, (2011). Viral factor TAV recruits TOR/S6K1 signalling to activate reinitiation after long ORF translation. *EMBO J*, 30(7):1343-56.

Schepetilnikov M, y Ryabova L.A, (2018). Recent Discoveries on the Role of TOR (Target of Rapamycin) Signaling in Translation in Plants. *Plant Physiol*, 176(2):1095-1105.

Sheen J, (2014). Master regulators in plant glucose signaling networks. *J Plant Biol*, 57(2):67-79.

Shen W, Bobay B.G, Greeley L.A, Reyes M.I, Rajabu C.A, Blackburn R.K, Dallas M.B, Goshe M.B, Ascencio-Ibáñez J.T, Hanley-Bowdoin L, (2018). Sucrose Nonfermenting 1-Related Protein Kinase 1 Phosphorylates a Geminivirus Rep Protein to Impair Viral Replication and Infection. *Plant Physiol*, 178(1):372-389.

Shen W, Reyes M.I, Hanley-Bowdoin L, (2009). *Arabidopsis* protein kinases GRIK1 and GRIK2 specifically activate SnRK1 by phosphorylating its activation loop. *Plant Physiol*, 150(2):996-1005.

Shen W, y Hanley-Bowdoin L, (2006). Geminivirus infection up-regulates the expression of two *Arabidopsis* protein kinases related to yeast SNF1- and mammalian AMPK-activating kinases. *Plant Physiol*, 142(4):1642-55.

Shi L, Wu Y, Sheen J. (2018). TOR signaling in plants: conservation and innovation. *Development*. 9;145(13): dev160887.

Signorelli S, Tarkowski LP, Van den Ende W, Bassham DC, (2019). Linking Autophagy to Abiotic and Biotic Stress Responses. *Trends Plant Sci*. 24(5):413-430.

Soto-Burgos J, y Bassham D.C, (2017). SnRK1 activates autophagy via the TOR signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 12(8): e0182591.

Soto-Burgos J, Zhuang X, Jiang L, Bassham DC, (2018). Dynamics of Autophagosome Formation. *Plant Physiol*, 176(1):219-229.

Steinhorst L, y Kudla J (2013). Calcium and reactive oxygen species rule the waves of signaling. *Plant Physiol*, 163(2):471-85.

Stitz M, Kuster D, Reinert M, Schepetilnikov M, Berthet B, Reyes-Hernández J, Janocha D, Artins A, Boix M, Henriques R, Pfeiffer A, Lohmann J, Gaquerel E,

Sugden C, Crawford R.M, Halford N.G, Hardie D.G, (1999). 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(4):433–9.

Suttangkakul A, Li F, Chung T, Vierstra R.D, (2011). The ATG1/ATG13 protein kinase complex is both a regulator and a target of autophagic recycling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 23(10):3761-79.

Szczesny R, Büttner D, Escolar L, Schulze S, Seiferth A, Bonas U, (2010). Suppression of the AvrBs1-specific hypersensitive response by the YopJ effector homolog AvrBsT from *Xanthomonas* depends on a SNF1-related kinase. *New Phytol*, 187(4):1058-1074.

Tang D, Wang G, Zhou J.M, (2017). Receptor Kinases in Plant-Pathogen Interactions: More Than Pattern Recognition. *Plant Cell*, 29(4):618-637.

Tang R.J, Zhao F.G, Garcia V.J, Kleist T.J, Yang L, Zhang H.X, Luan S, (2015). Tonoplast CBL–CIPK calcium signaling network regulates magnesium homeostasis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci*, 112(10):3134-9.

Tatebe H, Shiozaki K, (2017). Evolutionary Conservation of the Components in the TOR Signaling Pathways. *Biomolecules*, 7(4):77.

Tcherkezian J, Cargnello M, Romeo Y, Huttlin E.L, Lavoie G, Gygi S.P, Roux P.P, (2015). Proteomic analysis of cap-dependent translation identifies LARP1 as a key regulator of 5'TOP mRNA translation. *Genes Dev*, 28(4):357-71.

Teixeira P.J.P, Colaianni N.R, Fitzpatrick C.R, Dangl J.L, (2019). Beyond pathogens: microbiota interactions with the plant immune system. *Curr Opin Microbiol*, 49:7-17.

Thakur P, Saini N.K, Thakur V.K, Gupta V.K, Saini R.V, Saini A.K, (2021). Rhamnolipid the Glycolipid Biosurfactant: Emerging trends and promising strategies in the field of biotechnology and biomedicine. *Microb Cell Fact*, 20(1):1.

Thi M.T.T, Wibowo D, Rehm B.H.A, (2020). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Int J Mol Sci*, 21(22):8671.

Thomma B.P, Nürnberger T, Joosten M.H, (2011). Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *The Plant Cell*, 23(1): 4–15.

Tolker-Nielsen T, (2014). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: from molecular biofilm biology to new treatment possibilities. *APMIS Suppl. Dec*, (138):1-51.

Tomé F, Nägele T, Adamo M, Garg A, Marco-Llorca C, Nukarinen E, Pedrotti L, Peviani A, Simeunovic A, Tatkiewicz A, Tomar M, Gamm M, (2014). The low energy signaling network. *Front Plant Sci*. 17(5):353.

Torres-Olmos A, Méndez-Gómez M, Castro-Mercado E, Peña-Uribe CA, Campos-García J, López-Bucio J, Reyes-de la Cruz H, García-Pineda E, (2022). Hydrogen peroxide modulates target of rapamycin (TOR) in *Arabidopsis thaliana* seedlings to control growth and development.

Tremblay J, Richardson A.P, Lépine F, Déziel E, (2007). Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environ Microbiol*, 9(10): 2622-30.

Van Leene J, Han C, Gadeyne A, (2019). Capturing the phosphorylation and protein interaction landscape of the plant TOR kinase. *Nature Plants*, (5):316–327.

Van Schaik E.J, Giltner C.L, Audette G.F, Keizer D.W, Bautista D.L, Slupsky C.M, Sykes B.D, Irvin R.T, (2005). DNA binding: a novel function of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili. *J Bacteriol*, 187(4):1455-64.

Varnier, A.L, Sanchez L, Vatsa P, Boudesocque L, Garcia-Brugger A, Rabenoelina F, Sorokin A, Renault J.H, Kauffmann S, Pugin A, Clement C, Baillieul F, Dorey S, (2009), Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. *Plant Cell Environ*, (32): 178-193.

Veetilvalappil VV, Manuel A, Aranjani JM, Tawale R, Koteshwara A, (2022). Pathogenic arsenal of *Pseudomonas aeruginosa*: an update on virulence factors. *Future Microbiol*, 17:465-481.

Verstraeten I, Schotte S, Geelen D, (2014). Hypocotyl adventitious root organogenesis differs from lateral root development. *Front Plant Sci.* 29; 5:495.

Vilasó Cadre J.E, Rodríguez Gámez O, Ábalos Rodríguez A, (2017). EXTRACCIÓN DE PETRÓLEO EN SUELO CONTAMINADO EMPLEANDO RAMNOLÍPIDOS PRODUCIDOS POR *Pseudomonas aeruginosa* ORA9. *Rev Int de Contam*, 33(3): 485-493.

Vucicevic L, Misirkic M, Janjetovic K, Vilimanovich U, Sudar E, Isenovic E, Prica M, Harhaji-Trajkovic L, Kravic-Stevovic T, Bumbasirevic V, Trajkovic V, (2011). Compound C induces protective autophagy in cancer cells through AMPK inhibition-independent blockade of Akt/mTOR pathway. *Autophagy.* J7(1):40-50.

Wagener B.M, Anjum N, Christiaans S.C, Banks M.E, Parker J.C, Threet A.T, Walker R.R, Isbell K.D, Moser S.A, Stevens T, Alexeyev M.F, Audia J.P, Richter W, Hardy K.S, Saleh L.A, Morgan C, Pittet J.F, (2020). Exoenzyme Y Contributes to End-Organ Dysfunction Caused by *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia in Critically Ill Patients: An Exploratory Study. *Toxins (Basel)*, 12(6):369.

Wang H, Hao L, Shung C.Y, Sunter G, Bisaro D.M, (2003). Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Plant Cell*, 5(12):3020-32.

Wang P, Mugume Y, Bassham DC, (2017). New advances in autophagy in plants: regulation, selectivity and function. *Semin Cell Dev Biol*, S1084-9521(17)30129-5.

Wang P, Zhao Y, Li Z, Hsu C.C, Liu X, Fu L, Hou Y.J, Du Y, Xie S, Zhang C, Gao J, Cao M, Huang X, Zhu Y, Tang K, Wang X, Tao WA, Xiong Y, Zhu J.K, (2017). Reciprocal regulation of the TOR kinase and ABA receptor balances plant growth and stress response. *Mol Cell* 69, 100112. e6.

Waszczak C, Carmody M, Kangasjärvi J, (2018). Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. *Annu Rev Plant Biol*, 69:209-236.

Wilhelm S, Gdynia A, Tielen P, Rosenau F, Jaeger K.E, (2007). The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility and biofilm formation. *J. Bacteriol*, 189(18), 6695–6703.

- Williams S.P, Rangarajan P, Donahue J.L, Hess J.E, Gillaspay G.E, (2014). Regulation of Sucrose non-Fermenting Related Kinase 1 genes in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci*, (5):324.
- Windram O, y Denby K.J, (2015). Modelling signaling networks underlying plant defence. *Curr Opin Plant Biol*, 27, 165–171.
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson G.V, Provart N.J, (2007). An ‘Electronic Fluorescent Pictograph’ browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One*, 2(8): e718.
- Wu Y, Shi L, Li L, Fu L, Liu Y, Xiong Y, Sheen J, (2019). Integration of nutrient, energy, light, and hormone signalling via TOR in plants. *J Exp Bot*, 70(8):2227-2238.
- Wurzinger B, Mair A, Fischer-Schrader K, Nukarinen E, Roustan V, Weckwerth W, Teige M, (2017). Redox state-dependent modulation of plant SnRK1 kinase activity differs from AMPK regulation in animals. *FEBS Lett*. 591(21):3625-3636.
- Xie X, He Z, Chen N, Tang Z, Wang Q, Cai Y, (2019). The Roles of Environmental Factors in Regulation of Oxidative Stress in Plant. *Biomed Res Int*. 2019:9732325.
- Xiong Y, Contento AL, Bassham DC, (2007). Disruption of autophagy results in constitutive oxidative stress in *Arabidopsis*. *Autophagy*, 3: 257–258.
- Xiong Y, Contento AL, Nguyen PQ, Bassham DC, (2007). Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 143(1):291-9.
- 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, y Sheen J, (2012). Rapamycin and glucose–target of rapamycin (TOR) protein signaling in plants. *Journal of Biological Chemistry*, (28): 2836–2842.

Yan S, y Wu G, (2019). Can Biofilm Be Reversed Through Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*? *Front Microbiol*, 23;10:1582.

Yan Y, Zhou XE, Xu HE, Melcher K, (2018). Structure and Physiological Regulation of AMPK. *Int J Mol Sci*. 19(11):3534.

Yang WL, Perillo W, Liou D, Marambaud P, Wang P, (2012). AMPK inhibitor compound C suppresses cell proliferation by induction of apoptosis and autophagy in human colorectal cancer cells. *J Surg Oncol*. 106(6):680-8.

Yin Z, Pascual C, Klionsky D, (2016). Autophagy: machinery and regulation. *Microb Cell*, 3(12):588–96.

Yoshimoto K, Jikumaru Y, Kamiya Y, Kusano M, Consonni C, Panstruga R, Ohsumi Y, Shirasu K, (2009). Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 21(9):2914-27.

Zeng B, Wang C, Zhang P, Guo Z, Chen L, Duan K, (2020). Heat shock protein DnaJ in *Pseudomonas aeruginosa* affects biofilm formation via pyocyanin production. *Microorganisms*, 8(3): 395.

Zhang Y, Wang Y, Wen W, Shi Z, Gu Q, Ahammed GJ, Cao K, Shah Jahan M, Shu S, Wang J, Sun J, Guo S, (2021). Hydrogen peroxide mediates spermidine-induced autophagy to alleviate salt stress in cucumber. *Autophagy*,17(10):2876-2890.