

# UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctora en Ciencias  
Biológicas

## **Estudio del papel de proteínas mitocondriales en la regulación del crecimiento, las vías hormonales y la defensa frente a estrés en plantas**

Lic. María Victoria Canal

Director de Tesis: Dra. Elina Welchen  
Co-director de Tesis: Dr. Daniel Gonzalez

Laboratorio de Biología Molecular. Instituto de Agrobiotecnología del  
Litoral. CONICET – Universidad Nacional del Litoral

-2023-

**Agradecimientos**

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, por brindarme la posibilidad de realizar una carrera universitaria y haberme otorgado el título de Licenciada en Biotecnología, y más tarde, el de Doctora en Ciencias Biológicas. También por permitirme pertenecer al cuerpo docente de esta prestigiosa Universidad.

A CONICET por el financiamiento durante todos estos años de investigación.

Al Instituto de Agrobiotecnología del Litoral, liderado por la Dra. Raquel Chan, por abrirme sus puertas allá por el 2015 y dejarme desarrollar mi profesión y explorar el mundo de la ciencia durante más de 8 años.

Al Dr. Daniel Gonzalez, por darme la posibilidad de realizar el doctorado en su laboratorio, y guiarme durante 6 años de investigación, transmitiendo profesionalismo y respeto.

Especialmente a Eli, mi directora de tesis y mucho más también. Nada hubiese sido posible sin su apoyo diario. Cada día con cada palabra de aliento y con cada discusión de ideas, me permitieron formarme personal y científicamente, dándome herramientas y valores fundamentales que me llevo para siempre. Gracias por siempre entender, gracias por tu tiempo y por sobre todo, gracias por tu cariño.

Al grupo de trabajo, que fueron colegas y amigos ante todo. Gracias por el apoyo incondicional, la ayuda brindada en cada experimento, sus palabras de aliento, y las risas, que por suerte nunca faltaron.

Por último, a aquellos que fueron mi pilar fundamental, mi familia. Ellos sí que saben de todo el esfuerzo, tiempo y dedicación, siempre alentando y apoyando cada uno de mis pasos. Siempre por ellos.

## **Aportes Científico-Tecnológicos**

El presente trabajo de Tesis fue llevado a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (IAL, UNL-CONICET). Los resultados obtenidos dieron lugar a las siguientes publicaciones científicas en revistas internacionales con referato estricto:

1. **Canal, M. V.**, Mansilla N., Gras D. E., Ibarra A., Figueroa C. M., Gonzalez D. H., Welchen E. (2023). Cytochrome c levels affect the TOR pathway to regulate growth and metabolism under energy deficient conditions. *New Phytologist*, *en prensa*.
2. Racca, S., Gras, D. E., **Canal, M. V.**, Ferrero, L. V., Rojas, B. E., Figueroa, C. M., Ariel, F. D., Welchen, E., & Gonzalez, D. H. (2022). Cytochrome c and the transcription factor ABI4 establish a molecular link between mitochondria and ABA-dependent seed germination. *New Phytologist*, 235(5), 1780-1795.
3. Welchen, E., **Canal, M. V.**, Gras, D. E., & Gonzalez, D. H. (2021). Cross-talk between mitochondrial function, growth, and stress signalling pathways in plants. *Journal of Experimental Botany*, 72(11), 4102-4118.
4. Pacheco, J. M.\*, **Canal, M. V.\***, Pereyra, C. M., Welchen, E., Martínez-Noël, G. M. A., & Estevez, J. M. (2021). The tip of the iceberg: Emerging roles of TORC1, and its regulatory functions in plant cells. *Journal of Experimental Botany*, 72(11), 4085-4101. (\*) Igual contribución.

## Índice

<b>Abreviaturas y símbolos .....</b>	<b>8</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>10</b>
<b>1. Introducción general .....</b>	<b>12</b>
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>14</b>
<b><i>Capítulo 1: Estudio de parámetros de crecimiento y metabólicos en plantas con niveles reducidos de CYTc-1. Conexión con vías reguladoras del crecimiento y metabolismo.....</i></b>	<b>15</b>
<b>3. Introducción .....</b>	<b>16</b>
3.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> como organismo modelo .....	16
3.2 Las mitocondrias: estructura y función.....	17
3.2.1 La cadena de transporte de electrones mitocondrial (mETC) .....	19
3.2.2 El Citocromo c .....	22
3.3 La etapa de germinación .....	24
3.3.1 Rol de las mitocondrias en la germinación.....	24
3.4 El complejo TOR.....	25
3.4.1 Conexión con la vía SnRK1 .....	29
3.5 La autofagia como proceso celular esencial .....	30
<b>4. Objetivos .....</b>	<b>33</b>
<b>5. Materiales y Métodos.....</b>	<b>34</b>
5.1 Materiales .....	34
5.1.1 Material vegetal .....	34
5.1.2 Medio de cultivo para el crecimiento de <i>A. thaliana</i> .....	34
5.2 Métodos.....	36
5.2.1 Condiciones de crecimiento en cámara de cultivo .....	36
5.2.2 Análisis de la longitud de la raíz.....	37
5.2.3 Análisis fenotípico del tejido aéreo.....	37
5.2.4 Ensayos de germinación.....	37

5.2.5	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	38
5.2.6	Ensayo de privación de nutrientes o “hambre” .....	38
5.2.7	Tratamientos con inhibidores .....	39
5.2.8	Tinción de raíces y microscopía confocal .....	39
5.2.9	Mediciones de ATP .....	39
5.2.10	Extracción y determinación de clorofila, azúcares solubles y aminoácidos totales	40
5.2.11	Cuantificación de almidón .....	41
5.2.12	Cuantificación de aminoácidos por HPLC .....	41
5.2.13	Extracción de ARN y análisis de expresión génica .....	41
5.2.14	Análisis de <i>Western Blot</i> .....	42
5.2.15	Análisis estadístico .....	43
<b>6.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>44</b>
6.1	Estudio de mutantes deficientes en CYTc .....	44
6.1.1	Análisis del proceso de germinación .....	44
6.1.2	Caracterización del crecimiento de la raíz e identificación de parámetros mitocondriales y metabólicos .....	46
6.2	Interacción entre la función mitocondrial y el proceso de autofagia .....	55
6.2.1	Evaluación del proceso de autofagia en mutantes <i>cytc-1</i> .....	55
6.2.2	Obtención y caracterización de líneas de cruza <i>atg5-1 x cytc-1a</i> y <i>atg7-2</i> <i>x cytc-1b</i> .....	59
6.2.2.1	Determinación del nivel de autofagia y contenido de aminoácidos	59
6.2.2.2	Análisis fenotípico .....	60
6.2.2.3	Análisis del efecto de restricción de carbono .....	62
6.3	Interacción entre el CYTc y la vía de SnRK1 .....	65
6.4	Interacción entre el CYTc y la vía TOR .....	67
6.4.1	Análisis de los niveles de CYTc en plantas mutantes en la vía TOR .....	67
6.4.1.1	Evaluación de los niveles de transcritos y proteínas .....	67
6.4.1.2	Efecto de la sobreexpresión de CYTc .....	70
6.4.2	Estudio de la vía TOR en plantas mutantes <i>cytc-1a</i> y <i>cytc-1b</i> .....	73

6.4.2.1	Análisis transcripcional .....	73
6.4.2.2	Medidas de la actividad TOR.....	75
6.4.2.3	Obtención y análisis de líneas con elevados niveles de TOR .....	79
<b>7.</b>	<b>Discusión de Resultados .....</b>	<b>87</b>
7.1	Regulación del crecimiento y metabolismo a través del CYTc .....	87
7.1.1	¿Cuáles son las señales que regulan el crecimiento y desarrollo en plantas? Los aminoácidos como moléculas señal.....	87
7.1.2	La autofagia como respuesta frente a la “señal de alarma”.....	89
7.2	Interacción entre el CYTc y la vía TOR.....	91
7.2.1	La deficiencia en CYTc-1 impacta en los niveles de activación de TOR	91
7.2.2	¿Cómo se establece la comunicación entre la mitocondria y TOR? .....	92
<b>Capítulo 2: Estudio del efecto de la sobreexpresión de CYTc-1 en plantas de interés agronómico.....</b>		<b>98</b>
<b>8.</b>	<b>Introducción.....</b>	<b>99</b>
8.1	Crecimiento y desarrollo del maíz ( <i>Zea mays</i> ) .....	100
8.1.1	Etapas vegetativas .....	100
8.1.2	Etapas reproductivas.....	102
8.2	La importancia del Nitrógeno (N) para el crecimiento del maíz .....	103
8.3	Etapa de desarrollo y crecimiento del arroz ( <i>Oryza sativa</i> ) .....	104
8.3.1	Etapa de plántula.....	104
8.3.2	Etapa vegetativa.....	105
8.3.3	Etapa reproductiva.....	106
<b>9.</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>108</b>
<b>10.</b>	<b>Materiales y Métodos .....</b>	<b>109</b>
10.1	Construcciones utilizadas para transformar plantas de maíz .....	109
10.2	Construcciones para transformar plantas de arroz.....	109
10.3	Cultivo de plantas de maíz.....	110
10.3.1	Experimento en condiciones variables de N .....	110
10.3.2	Medición de parámetros morfológicos .....	111
10.3.2.1	Largo de raíz .....	111

10.3.2.2	Largo del tallo .....	111
10.3.2.3	Peso tejido seco .....	112
10.3.2.4	Partición materia seca .....	112
10.3.2.5	Cantidad de hojas expandidas.....	112
10.3.2.6	Diámetro del tallo.....	112
10.3.2.7	Parámetros fotosintéticos .....	112
10.4	Cultivo de plantas de arroz .....	113
10.4.1	Altura de las plantas .....	114
10.4.2	Medida de la producción.....	114
10.4.3	Determinaciones de respiración.....	114
10.5	Análisis de la expresión de proteínas.....	115
10.5.1	Extracción de proteínas totales.....	115
10.5.2	Separación electroforética (SDS-PAGE) y <i>Western Blot</i> .....	115
<b>11.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>116</b>
11.1	Caracterización de líneas de maíz sobreexpresantes de CYTc-1 (ZmAtCYTc) 116	
11.1.1	Análisis de la expresión de CYTc .....	116
11.1.2	Análisis fenotípico en condiciones normales de crecimiento.....	117
11.1.3	Crecimiento en hidroponía o condiciones de cultivo líquido .....	118
11.1.3.1	Crecimiento en condiciones variables de nitrógeno .....	120
11.1.4	Análisis de la fluorescencia de la clorofila.....	123
11.2	Caracterización de líneas de arroz sobreexpresantes de CYTc-1 (OsAtCYTc) 125	
11.2.1	Análisis de los niveles de sobreexpresión de CYTc.....	125
11.2.2	Análisis fenotípico.....	125
11.2.3	Medidas de respiración.....	126
<b>12.</b>	<b>Discusión de Resultados.....</b>	<b>128</b>
<b>13.</b>	<b>Conclusiones generales .....</b>	<b>131</b>
<b>14.</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>132</b>

**Abreviaturas y símbolos**

ABA	ácido abscísico	EDTA	ácido etilen diamino tetraacético
ACT	actina	EI	espacio intermembrana
ADN	ácido desoxirribonucleico	ERV1	sulfhidrilo oxidasa
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia	E2FA	E2 <i>promoter-binding factor A</i>
ADP	adenosin difosfato	FADH	flavín adenín dinucleótido
AMA	antimicina A	FLZ	<i>FCS-like zinc finger</i>
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>	g	gramo
AN	alto nitrógeno	GA	giberelinas
AOX	oxidasa alternativa	GAPC	gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
ARN	ácido ribonucleico	GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
ARNm	ácido ribonucleico mensajero	GLDH	L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa
ARNr	ácido ribonucleico ribosomal	GRIKs	<i>geminivirus Rep-interacting kinases</i>
ARNt	ácido ribonucleico de transferencia	h	hora
ATG	<i>autophagy related protein</i>	HCl	ácido clorhídrico
ATP	adenosín trifosfato	HMGR	3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa
ADP	adenosín difosfato	HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
BCAA	aminoácidos de cadena ramificada	IgG	inmunoglobulina G
BN	bajo nitrógeno	IRGA	<i>Infra Red Gas Analysis</i>
CaMV	virus del mosaico de la coliflor	kDa	kilodaltons
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono	L	litro
COX	citocromo c oxidasa	LST8	<i>Lethal with Sec Thirteen 8</i>
CoQ	coenzima Q	LD	día largo
cm	centímetros	ME	membrana externa
CTAB	bromuro de hexadeciltrimetilamonio	mETC	<i>mitochondrial Electron Transport Chain</i>
CYTc	citocromo c	mg	miligramo/s
DAS	días después de la siembra	MgCl <sub>2</sub>	cloruro de magnesio
2-4 DNF	2-4 dinitrofenol	MI	membrana interna
DLDH	D-lactato deshidrogenasa		
dNTP	desoxinucleótidos trifosfato (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP, dTTP)		
e <sup>-</sup>	electrones		

MIA40	<i>Mitochondrial Import and Assembly protein 40</i>	PF	peso fresco
ml	mililitro/s	PMSF	fluoruro de fenil metil sulfonilo
MM	matriz mitocondrial	PSII	fotosistema 2
mm	milímetros	PVDF	fluoruro de polivinilideno
mM	milimolar	RAPTOR	<i>Regulatory Associated Protein of TOR</i>
MS	medio de cultivo Murashige-Skoog	ROS	especies reactivas del oxígeno
MRR	<i>Mitochondrial Retrograde Response</i>	rpm	revoluciones por minuto
N	nitrógeno	RPS6	<i>ribosomal protein S6</i>
NaCl	cloruro de sodio	RT-qPCR	<i>real time quantitative PCR</i>
NAD(P)	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato	S6K	<i>ribosomal protein S6 kinase</i>
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido	SDS	dodecilsulfato de sodio
NDA1/NDA2	NADH deshidrogenasas alternativas internas	SHAM	ácido salicilhidroxámico
NDB1/NDB2	NADH deshidrogenasas alternativas externas	SnRK1	<i>Sucrose non-fermenting-related Kinase 1</i>
nm	nanómetros	SPS	sacarosa fosfato sintasa
nmol	nanomol/es	<i>Taq</i>	<i>Thermus Aquaticus</i>
NR	nitrito reductasa	TMRM	tetrametilrodamina metil éster
O <sub>2</sub>	oxígeno molecular	TOR	<i>Target of Rapamycin</i>
Os	<i>Oryza sativa</i>	TCA	ácido tricarbóxico
OXPPOS	fosforilación oxidativa	Tris	tris(hidroximetil)-aminometano
P	fosforilación	T6P	trehalosa-6-fosfato
P <sub>i</sub>	fosfato inorgánico	UBI	ubiquitina
p/v	peso en volumen	UPRmt	<i>mitochondrial Unfolded Protein Response</i>
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida	UV	ultravioleta
PAT	fosfotricin acetiltransferasa	v/v	volumen en volumen
PCD	<i>Programmed Cell Death</i>	WT	<i>Wild Type</i>
PCR	reacción en cadena de la polimerasa	YAK1	<i>Yet Another Kinase 1</i>
		Zm	<i>Zea mays</i>
		°C	grados centígrados
		μL	microlitro/s
		μM	micromolar

**Resumen**

La función mitocondrial es esencial para el crecimiento de las plantas, pero los mecanismos que vinculan el crecimiento y el metabolismo con los cambios en la producción de energía mitocondrial no están completamente dilucidados. Para profundizar en este análisis estudiamos plantas con niveles reducidos de *CYTC-1*, uno de los dos genes que codifican para el transportador de electrones de la cadena respiratoria Citocromo c (CYTc) en *Arabidopsis thaliana*. De esta manera buscamos comprender cómo las mitocondrias comunican su estado energético debido a alteraciones en su función para coordinar el metabolismo y el crecimiento en plantas.

Las plantas deficientes en *CYTC-1* muestran una disminución del potencial de membrana mitocondrial y un menor contenido de ATP, incluso en presencia de fuentes de carbono exógenas. También exhiben un mayor contenido de aminoácidos totales, niveles de autofagia inducidos basalmente y una mayor resistencia al estrés nutricional causado por la oscuridad prolongada. Todas estas evidencias son coincidentes con lo que ocurre en plantas que presentan señales de inanición o hambre activas. Además, la deficiencia de *CYTC-1* afecta la activación de la vía TOR, reduciendo los niveles de fosforilación de las proteínas blanco S6K y RPS6, así como los niveles totales de proteína S6K debido a un aumento en su degradación a través del proteasoma y la autofagia. La sobreexpresión de TOR restaura el crecimiento y parámetros metabólicos afectados en las mutantes *cytc-1*, incluso cuando el potencial de membrana mitocondrial y los niveles de ATP permanecen bajos. Proponemos que las plantas con deficiencia en CYTc coordinan su metabolismo y disponibilidad de energía reduciendo la activación de la vía TOR, como una señal preventiva para ajustar el crecimiento previo al agotamiento de energía, proporcionando así un mecanismo mediante el cual los cambios en la actividad mitocondrial se traducen al resto de la célula.

Además, los niveles de CYTc podrían regular el crecimiento de las plantas. Plantas de *Arabidopsis thaliana* con mayores niveles de esta hemoproteína presentan características de interés en Agrobiotecnología. Así, obtuvimos plantas de arroz y maíz transformantes estables con mayores niveles de CYTc a fin de evaluar su impacto en estos cultivos de interés comercial, y analizamos su crecimiento en diferentes condiciones nutricionales.

**Abstract**

Mitochondrial function is essential for plant growth but the mechanisms involved in adjusting growth and metabolism to changes in mitochondrial energy production are not fully understood.

We studied plants with reduced expression of *CYTC-1*, one of two genes encoding the respiratory chain component Cytochrome *c* (CYTc) in *Arabidopsis thaliana*, to understand how mitochondria communicate their status to coordinate metabolism and growth.

Plants with CYTc deficiency show decreased mitochondrial membrane potential and lower ATP content, even when carbon sources are present. They also exhibit higher free amino acid content, induced autophagy, and increased resistance to nutritional stress caused by prolonged darkness, similar to plants with triggered starvation signals. CYTc deficiency affects TOR pathway activation, reducing S6K and RPS6 phosphorylation, as well as total S6K protein levels due to increased protein degradation via proteasome and autophagy. TOR overexpression restores growth and other parameters affected in *cytc-1* mutants, even if mitochondrial membrane potential and ATP levels remain low. We propose that CYTc-deficient plants coordinate their metabolism and energy availability by reducing TOR pathway activation as a preventive signal to adjust growth in anticipation of energy exhaustion, thus providing a mechanism by which changes in mitochondrial activity are transduced to the rest of the cell.

Moreover, CYTc levels could regulate plant growth. *Arabidopsis thaliana* plants with higher levels of this hemoprotein exhibit characteristics of interest in Agrobiotechnology. Thus, we obtained stable transforming rice and maize plants with higher levels of CYTc to assess their impact on these commercially significant crops, and we analyzed their growth under different nutritional conditions.

## 1. Introducción general

Las plantas han evolucionado en un ambiente cargado de oxígeno, por lo que han desarrollado vías metabólicas capaces de utilizar el potencial energético contenido en esta molécula. Una de las principales vías catabólicas que les permite cumplir esta función es el proceso de respiración celular, llevado a cabo en las mitocondrias y que resulta esencial para la obtención de energía. En la membrana interna mitocondrial existen cuatro complejos multiproteicos y una hemoproteína soluble, el Citocromo *c* (CYTc), que posibilitan el transporte de electrones desde coenzimas reducidas al oxígeno molecular (O<sub>2</sub>), acoplado este proceso a la síntesis de ATP por medio de la ATP sintasa o Complejo V (Mansilla et al., 2018; Meyer et al., 2019).

Además de ser productoras de ATP, las mitocondrias funcionan como organelas sensoras y señalizadoras del estado energético celular, coordinando el desarrollo a través de la interacción con diferentes vías reguladoras del crecimiento, las que a su vez se interconectan con los mecanismos de acción de distintas hormonas vegetales (Racca et al., 2018; Welchen et al., 2021). Por otro lado, distintas proteínas con localización mitocondrial han sido involucradas en procesos celulares no canónicos, como la defensa de las plantas frente al ataque por patógenos bacterianos (Attallah et al., 2011; Colombatti et al., 2014; Mencia et al., 2020), o relacionados con resistencia al daño oxidativo generado por diferentes estreses abióticos, como exposición a UV-B, estrés salino (Colombatti et al., 2019; Garcia et al., 2019) y altos niveles de metabolitos tóxicos como el metilglioxal (Welchen et al., 2016), entre otros. Estas evidencias ampliarían las funciones originalmente atribuidas a las mitocondrias y las pondrían en el centro de regulación de una enorme cantidad de procesos, desde la producción y el control de la utilización de energía para el crecimiento, hasta la respuesta a estrés, pasando por la interacción con vías hormonales y otras vías centrales reguladoras del crecimiento (Welchen et al., 2021).

En estudios previos del laboratorio se le atribuyeron diversas funciones al CYTc asociadas a la regulación del crecimiento y desarrollo vegetal. Particularmente, en *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) se demostró que el CYTc regula de forma positiva el crecimiento, tanto en estadios tempranos del desarrollo, como así también en estadios más avanzados, aumentando la biomasa de roseta y generando un adelanto en el tiempo de floración (Racca et al., 2018). Por otro lado, se demostró que los niveles de CYTc influyen en la homeostasis de giberelinas (GA) para modular el crecimiento de las plantas. La producción de energía mediante la respiración dependiente de CYTc afecta el metabolismo de GA y los niveles de proteínas DELLA. En condiciones de deficiencia

de CYTc, se retrasa el crecimiento y desarrollo de la planta, y aumentan los niveles de carbohidratos (Racca et al., 2018).

Estos resultados revelan la existencia de un mecanismo regulador que vincula el metabolismo energético mitocondrial de las plantas a la regulación hormonal del crecimiento. Este mecanismo probablemente surgió para ajustar el crecimiento de las plantas al funcionamiento de las vías productoras de energía, evitando así el daño a las funciones celulares debido a una escasez de suministro de energía.

En este trabajo de tesis nos proponemos estudiar la conexión del CYTc con las vías centrales reguladoras del crecimiento *Target of Rapamycin* (TOR) y *Sucrose non-fermenting-related Kinase 1* (SnRK1), en *A. thaliana*. Por otro lado, teniendo en cuenta los resultados previos, nos planteamos obtener líneas de arroz (*Oryza sativa*) y maíz (*Zea mays*) con altos niveles de CYTc, a fin de conocer el impacto de esta proteína en el patrón de crecimiento de estas plantas y poder determinar la existencia de una ventaja productiva adicional.

## 2. Objetivos

- i. Analizar el impacto de la disminución del CYTc en el metabolismo de plantas de *Arabidopsis thaliana*.
- ii. Analizar el impacto de la disminución del CYTc en la germinación y el crecimiento de plantas de *Arabidopsis thaliana*.
- iii. Analizar el impacto de la disminución del CYTc en plantas con las vías de señalización TOR y SnRK1 alteradas.
- iv. Analizar una posible regulación de la biogénesis mitocondrial y la respiración por la vía TOR y SnRK1.
- v. Evaluar el efecto de aumentar los niveles de la proteína TOR, en plantas con menores niveles de CYTc.
- vi. Evaluar el proceso de autofagia en plantas con menores niveles de CYTc.
- vii. Caracterizar el crecimiento de líneas de plantas que presentan alteraciones en el proceso de autofagia.
- viii. Evaluar el impacto de afectar el proceso de autofagia en plantas con menores niveles de CYTc, mediante la obtención de líneas de cruza.
- ix. Analizar el impacto de incrementar los niveles de CYTc en plantas de arroz y maíz.

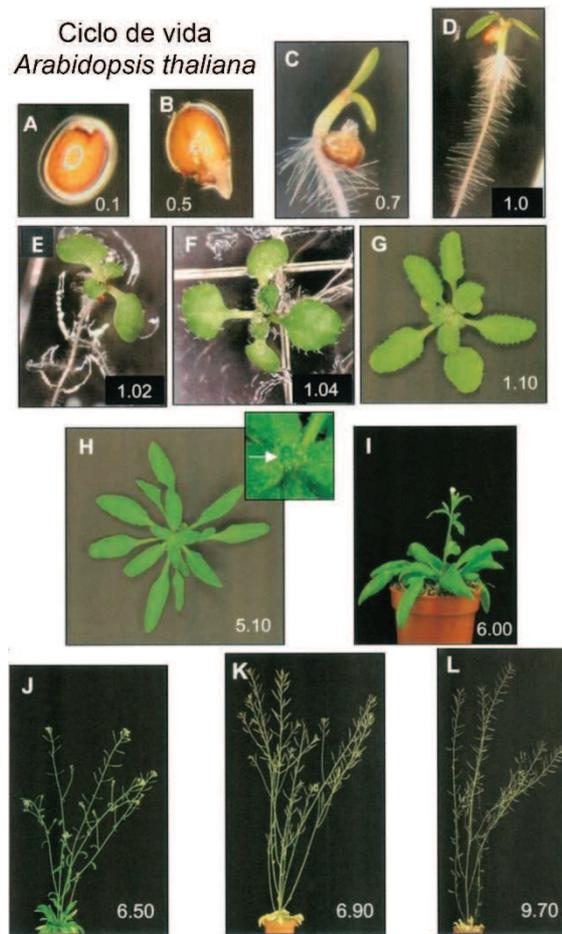
***Capítulo 1: Estudio de parámetros de crecimiento y metabólicos en plantas con niveles reducidos de CYTc-1. Conexión con vías reguladoras del crecimiento y metabolismo.***

### 3. Introducción

#### 3.1 *Arabidopsis thaliana* como organismo modelo

*A. thaliana* es una planta angiosperma dicotiledónea, perteneciente a la familia de las *Brassicaceas*. Presenta gran cantidad de ventajas que la han llevado a convertirse en un organismo modelo, útil para el campo de la investigación en diversas áreas. Entre las principales ventajas podemos destacar su ciclo de vida corto (60 días), tamaño pequeño, es capaz de autopolinizarse generando una gran cantidad de individuos, posee su genoma secuenciado y además se han desarrollado una gran cantidad de herramientas genéticas, que han permitido avances significativos en el campo de la fisiología, metabolismo, desarrollo vegetal, genética y epigenética (Koornneef & Meinke, 2010; Krämer, 2015).

Para analizar el crecimiento y el desarrollo de *A. thaliana*, Boyes et al. (2001) definieron una serie de estadios o etapas que permitieron unificar criterios a la hora de llevar a cabo un análisis fenotípico. En una condición normal de crecimiento con un fotoperiodo de día largo (LD) (16 h luz/8 h oscuridad) y 24°C, el ciclo de vida de *A. thaliana* tiene una duración estimada de 60 días. En la **Figura 1** se muestran los diferentes estadios establecidos por dichos autores. La primera etapa del desarrollo consiste en la germinación de la semilla que se evidencia luego de la emergencia de la radícula. Esta etapa tiene una duración de unas 24-48 h y permitirá la generación de una nueva plántula. Luego comienza la etapa de crecimiento vegetativo, donde ocurre un aumento de biomasa en la roseta y el surgimiento de nuevas hojas. Luego de aproximadamente 22 días de crecimiento se produce la floración, que se evidencia con la aparición del botón floral y la elongación inicial del tallo. Esto implica el pasaje a la etapa reproductiva donde se dará lugar a la producción de flores y silicuas. Finalmente, entre los días 45-60 se da inicio a la etapa de senescencia, donde las hojas de roseta comienzan a secarse y se produce la maduración y apertura de las vainas, liberando las semillas que darán lugar a una nueva generación.



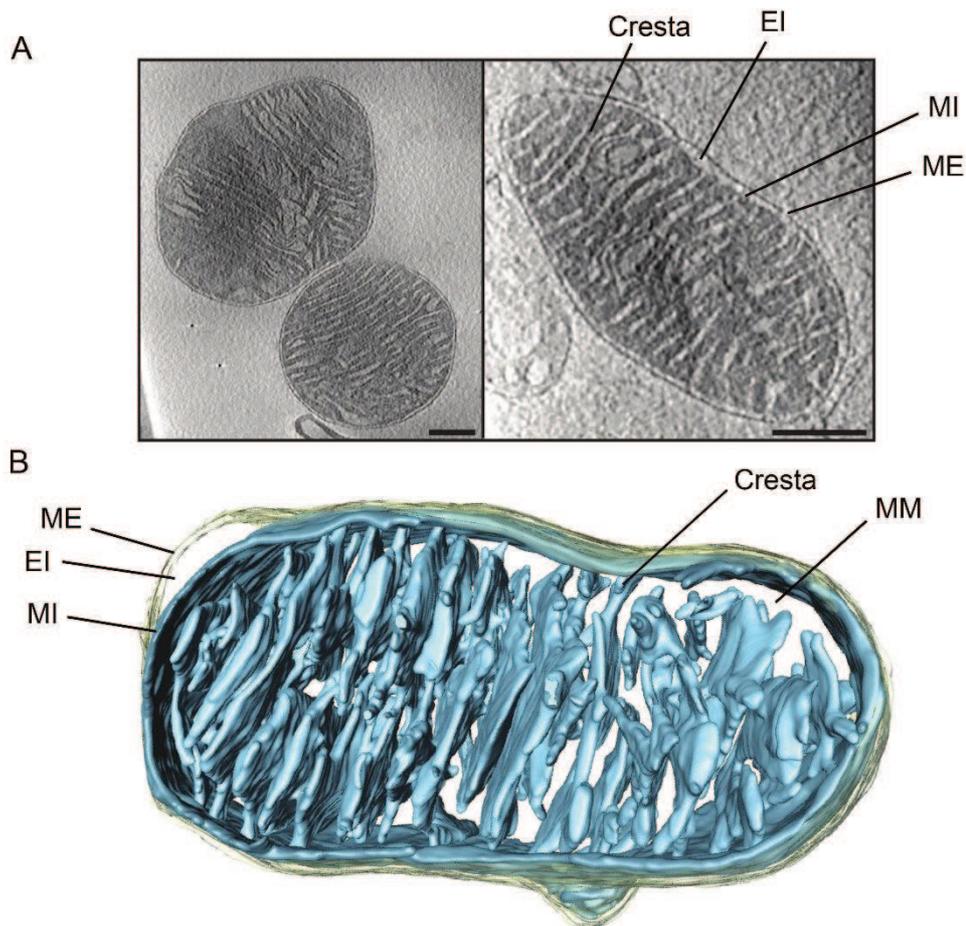
**Figura 1. Representación del ciclo de vida de *A. thaliana*.** Se indican cada una de sus etapas: germinación y desarrollo del embrión (**A, B**), establecimiento de la plántula (**C, D**), etapa vegetativa con salida de nuevas hojas (**E, F, G**), etapa reproductiva donde emerge el botón floral (**H, I**), desarrollo de ramas y nuevas flores (**J**), silicuas maduras con inicio de la etapa de senescencia (**K**), planta senescente con silicuas abiertas para la recolección de semillas (**L**). Imagen adaptada de Boyes et al. (2001). Los números corresponden a los estadios de crecimiento allí definidos de manera sistemática.

### 3.2 Las mitocondrias: estructura y función

Las mitocondrias son organelas celulares presentes en los organismos eucariotas, cuyo origen puede ser explicado por la teoría endosimbiótica, la cual establece que un organismo procariota fue incorporado por un organismo eucariota primitivo, donde el organismo procariota evolucionó con el tiempo hasta lo que actualmente conocemos como mitocondria. Estas organelas son consideradas semiautónomas ya que son capaces de reproducirse por sí solas, al poseer ADN, ARN, ribosomas y ARNt propios. El genoma mitocondrial codifica para ARNt, ARNr y 50 proteínas mitocondriales. Aunque, debido a una transferencia de genes de la mitocondria al núcleo durante un

proceso evolutivo, la mayoría de las proteínas mitocondriales (más de 1000) necesarias para que esta organela cumpla su papel en la homeostasis celular, se encuentran codificadas por genes presentes en el núcleo y luego se importan a los diferentes compartimentos mitocondriales mediante un conjunto de translocasas de proteínas (Carrie et al., 2013; Pfanner et al., 2014; Zimorski et al., 2014).

En cuanto a su estructura (**Figura 2**), tienen una membrana interna que rodea la matriz y una membrana externa que rodea la membrana interna, separando los compartimentos mitocondriales del citoplasma. La matriz interna contiene el genoma mitocondrial, ARN, ribosomas y enzimas solubles. La membrana externa contiene un gran número de moléculas de porina, una proteína transportadora que forma canales acuosos a través de la bicapa lipídica. Esta membrana actúa como un tamiz permeable a todas las moléculas de menos de 10000 Daltons, incluidas proteínas pequeñas. Estas moléculas pueden ingresar al espacio intermembrana, pero la mayoría de ellas son incapaces de atravesar la membrana interna, que es impermeable y está altamente especializada. A su vez, presenta múltiples pliegues denominados “crestas” que permiten una mayor superficie de contacto con el espacio intermembrana. En su bicapa lipídica contiene una elevada proporción del fosfolípido cardiolipina, que la vuelven impermeable a los iones, siendo solo permeable a pequeñas moléculas metabolizadas o necesarias por las enzimas mitocondriales de la matriz (Buchanan et al., 2015; Taiz & Zeiger, 2006). Por último, uno de los compartimentos principales desde el punto de vista funcional, es la matriz, donde ocurre la conversión del piruvato, proveniente de la glucólisis o de los ácidos grasos, a acetil CoA. Posteriormente es oxidado mediante el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), dando como principales productos dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y equivalentes de reducción como el NADH y FADH<sub>2</sub> (Buchanan et al., 2015; Taiz & Zeiger, 2006).



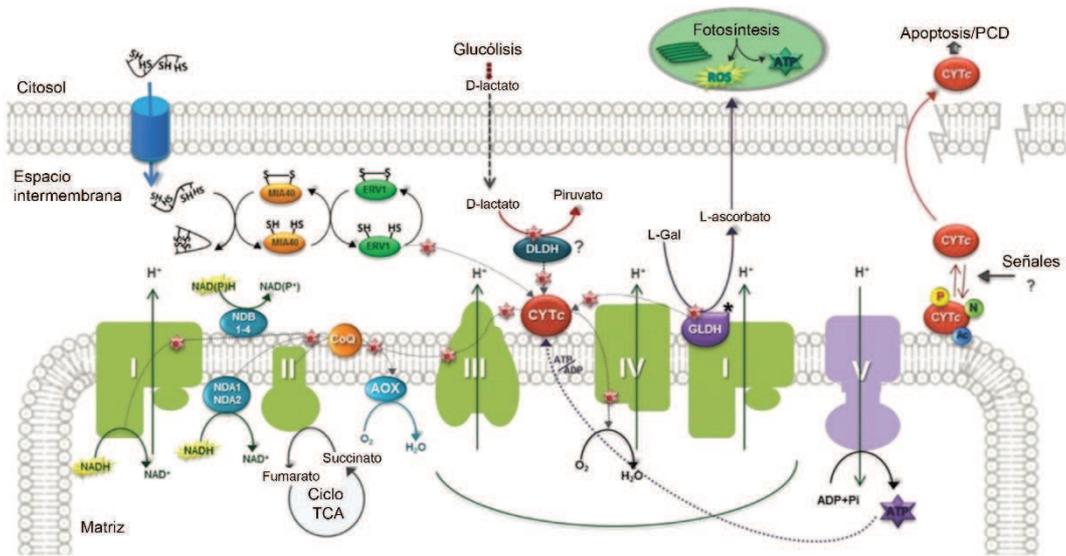
**Figura 2. Estructura de la mitocondria.** (A) Imágenes de microscopía electrónica donde se señalan sus principales estructuras. Membrana externa (ME), membrana interna (MI), espacio intermembrana (EI). Barras de escala: 250 nm. (B) Representación 3D de una mitocondria y sus partes, en la que además se señala la matriz mitocondrial (MM). Imagen adaptada de Brandt et al. (2017).

### 3.2.1 La cadena de transporte de electrones mitocondrial (mETC)

El paso final en la obtención de la energía a partir de los equivalentes de reducción provenientes del TCA ocurre en las crestas de la membrana interna mitocondrial, donde estas moléculas son oxidadas (Gilkerson et al., 2003; Vogel et al., 2006). Una de las principales vías por la cual se obtiene la energía es mediante la reducción de oxígeno molecular ( $O_2$ ) que ocurre durante el transporte final de electrones en la cadena respiratoria o transportadora de electrones mitocondrial (mETC, del inglés *mitochondrial Electron Transport Chain*). Esta vía requiere una serie de complejos enzimáticos ubicados en la membrana interna denominados: NADH deshidrogenasa (I), succinato

deshidrogenasa (II), Citocromo c reductasa (III) y Citocromo c oxidasa (IV); además de moléculas que funcionan como nexo, como la proteína Citocromo c (CYTc) que conecta el complejo III con el IV, y la coenzima ubiquinona que conecta el complejo I o II con el complejo III. Estos complejos de proteínas catalizan los múltiples pasos necesarios para transferir los electrones del NADH y FADH<sub>2</sub> al O<sub>2</sub>, generando agua y traslocando protones de la matriz interna al espacio intermembrana. El pasaje de los protones genera un gradiente electroquímico utilizado por el complejo V o ATP-sintasa, en la síntesis de ATP (Buchanan et al., 2015; Leslie et al., 1999; Taiz & Zeiger, 2006).

A su vez, las plantas presentan otras enzimas que sirven como vías alternativas a determinados pasos de la mETC. Sin embargo, estas no intervienen en el bombeo de protones de la matriz interna al espacio intermembrana por lo que implica una pérdida en la eficiencia de obtención de ATP. De todos modos, son esenciales para prevenir la sobre-reducción y el bloqueo de la mETC, especialmente durante situaciones de desequilibrio metabólico, energético y redox, como las causadas por el estrés oxidativo. Esto le otorga a la planta una mayor flexibilidad metabólica frente a condiciones adversas. Algunas de estas enzimas son NAD(P)H deshidrogenasas alternativas presentes en la cara interna y externa de la membrana interna y la oxidasa alternativa (AOX) (Meyer et al., 2019). AOX utiliza electrones de ubiquinona para reducir el oxígeno, evitando así los Complejos III y IV. En la **Figura 3**, se visualiza este proceso junto a las enzimas y complejos proteicos involucrados.



**Figura 3. Esquema representativo de los complejos enzimáticos, proteínas y moléculas que participan en la mETC.** Abreviaturas: CoQ, coenzima Q/ubiquinona; NDA1/NDA2, NADH deshidrogenasas alternativas internas; NDB1/NDB2, NADH deshidrogenasas alternativas externas; ERV1, sulfhidrilo oxidasa; DLDH, D-lactato deshidrogenasa; GLDH, L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa; L-Gal, L-galactono-1,4-lactona; AOX, oxidasa alternativa; MIA40, del inglés *Mitochondrial Import and Assembly protein 40*; PCD, del inglés *Programmed Cell Death*; ROS, especies reactivas del oxígeno; ATP, adenosín trifosfato; ADP, adenosín difosfato; P<sub>i</sub>, grupo fosfato inorgánico; P, fosforilación; N, nitración; Ac, acetilación. Imagen adaptada de Welchen & Gonzalez (2016).

Coordinar la actividad respiratoria mitocondrial con el suministro de nutrientes, el entorno celular y los requisitos energéticos de las plantas es crucial. Las señales celulares que afectan la función mitocondrial se conocen como señales anterógradas, mientras que aquellas que comunican el estado mitocondrial al resto de la célula se conocen como señales retrógradas. Una de estas vías de comunicación, conocida como la respuesta retrógrada mitocondrial (MRR, del inglés *Mitochondrial Retrograde Response*), está regulada por el factor de transcripción ANAC017 (Ng et al., 2014). En condiciones normales, ANAC017 permanece asociado con la membrana del retículo endoplásmico. Sin embargo, se transloca al núcleo para inducir el MRR al inhibir la vía dependiente de CYTc (De Clercq et al., 2013; Welchen et al., 2021). Además, algunas alteraciones en la actividad mitocondrial también producen la Respuesta de Proteínas Mitocondriales mal plegadas (UPR<sub>mt</sub>, del inglés *mitochondrial Unfolded Protein Response*). Esta respuesta se ha descrito preferentemente en animales, pero estudios indican que también ocurre en las plantas y es mediada por ANAC017 (Kacprzak et al., 2020). Además, las vías de señalización hormonal, como las vías de auxinas y etileno,

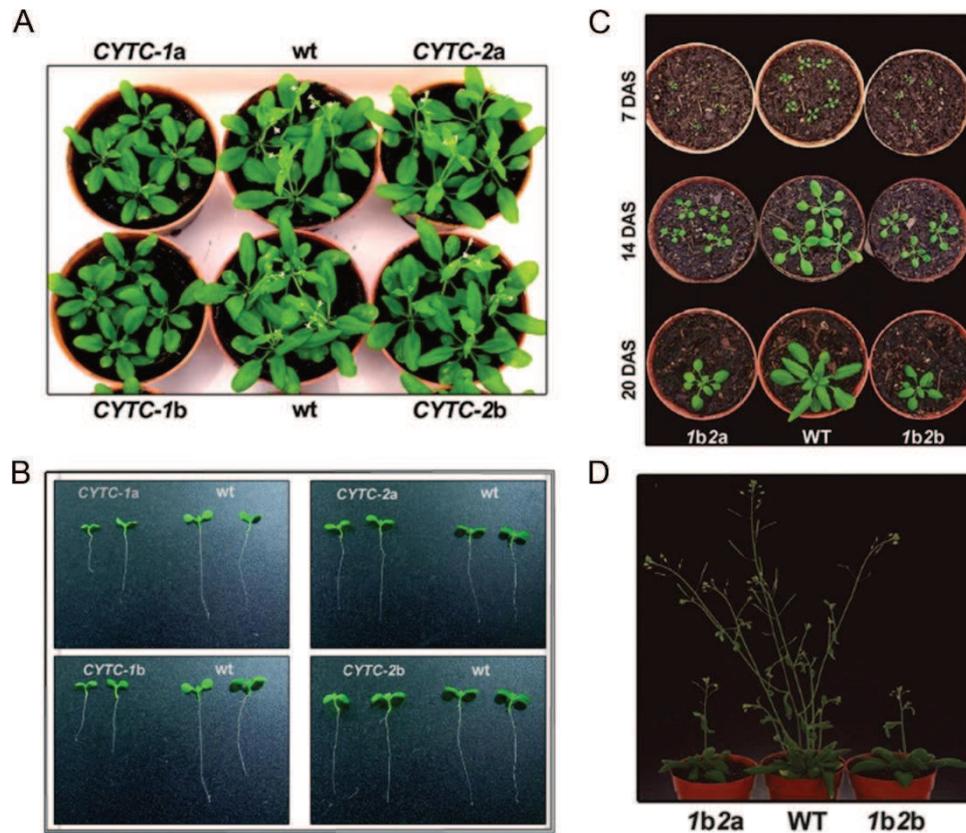
están asociadas con el MRR, siendo esta última independiente de ANAC017 (Ivanova et al., 2014; Kacprzak et al., 2020).

### 3.2.2 El Citocromo c

El Citocromo c (CYTc) es una pequeña hemoproteína hidrofílica de 12,5 kDA, que se encuentra en el espacio intermembrana o interaccionando débilmente con la membrana interna. Se caracteriza por ser transportador de electrones entre el complejo III y el complejo IV de la mETC. Además de esta función principal, también participa de procesos importantes para la célula como la síntesis de ascorbato, la degradación del metilglioal, el metabolismo del D-lactato, la muerte celular programada en mamíferos (Ow et al., 2008), estabilidad del complejo IV y el metabolismo redox (Welchen et al., 2016; Welchen & Gonzalez, 2016).

En *A. thaliana* el CYTc es codificado por dos genes, *CYTc-1* (At1g22840) y *CYTc-2* (At4g10040). El gen *CYTc-1* tiene un patrón de expresión preferencial en meristema apical del vástago, meristema apical de la raíz, en el extremo o “*tip*” de cotiledones y en primordios de hoja. Mientras que *CYTc-2* se expresa principalmente en tejido vascular de cotiledones, hojas, raíces e hipocotilos (Welchen & Gonzalez, 2005).

Para comprender su función como regulador del crecimiento en *A. thaliana*, se obtuvieron y caracterizaron dos mutantes insercionales por T-DNA para el gen *CYTc-1*, denominadas *cytc-1a* (mutante nula o conocida en inglés como *knock-out*) y *cytc-1b* (mutante con disminución marcada de la expresión o *knock-down* en inglés). Mientras que para el gen *CYTc-2* se caracterizaron dos mutantes nulas conocidas como *cytc-2a* y *cytc-2b*. Posteriormente, mediante cruces entre la línea de baja expresión para *CYTc-1* y las líneas mutantes nulas para el *CYTc-2*, se obtuvieron mutantes dobles con muy baja expresión de CYTc (*cytc-1b2a* y *cytc-1b2b*), las cuales han sido objeto de estudio en trabajos previos del laboratorio (Welchen et al., 2012). Cabe destacar que la ausencia total de *CYTc-1* y *CYTc-2* resulta letal a nivel embrionario.



**Figura 4. Fenotipos de plantas mutantes en *CYTc-1* y *CYTc-2* en diferentes estadios de desarrollo.** En estos esquemas se muestra el fenotipo de tamaño de roseta (**A**) y longitud de raíz (**B**) de plantas mutantes simples en *CYTc-1* y *CYTc-2*. Imágenes adaptadas de Welchen et al. (2012). En el panel (**C**) se muestra el tamaño de roseta a distintos tiempos de crecimiento (DAS: días después de la siembra) y en (**D**) el retraso en la transición a estadio reproductivo, de plantas mutantes dobles *cytc-1b2a* y *cytc-1b2b*. Imágenes adaptadas de Racca et al. (2018).

Un primer análisis fenotípico reveló que las mutantes simples *cytc-1* presentan un ligero retraso en el tiempo de desarrollo, evidenciado por un menor área de roseta y un retraso en la transición a estadio reproductivo, respecto a plantas salvajes (WT, del inglés *Wild-Type*) (Racca et al., 2018). Por su parte, las mutantes *cytc-2* no presentaron alteraciones en estos fenotipos (**Figura 4A**). Al analizar estadios más tempranos del desarrollo, se observó que las mutantes *cytc-1* tienen una menor longitud de raíz respecto a plantas WT, algo que no se observó para las mutantes *cytc-2* (**Figura 4B**). Al analizar las mutantes dobles *cytc-1b2a* y *cytc-1b2b*, se observaron fenotipos más severos respecto a plantas mutantes simples *cytc-1* en lo que respecta al tamaño de roseta y tiempo de floración (**Figura 4C, D**). Además, presentaron alteraciones metabólicas tales como mayor contenido de almidón y de azúcares solubles, y una homeostasis de GA alterada (Racca et al., 2018).

### 3.3 La etapa de germinación

La germinación es uno de los procesos más cruciales para la supervivencia de las especies vegetales ya que permite el establecimiento de una nueva generación y la propagación de la descendencia. Las semillas de *A. thaliana* están conformadas por un embrión cargado con proteínas de reserva y rodeado por dos envolturas: el endosperma y la testa. Luego de la embriogénesis, se produce la maduración de la semilla y su posterior deshidratación, lo que permite el ingreso a una etapa de dormancia o latencia hasta que las condiciones ambientales sean favorables para desencadenar con éxito la germinación (Paszkiwicz et al., 2017).

El evento inicial de la germinación comienza con la incorporación de agua por parte de una semilla seca madura mediante un proceso conocido como imbibición (Czarna et al., 2016). La imbibición puede ser definida como un evento trifásico que comienza con una rápida incorporación de agua por parte de la semilla deshidratada (fase I), seguida de un período de incorporación limitada de agua (fase II). Las dos primeras etapas se consideran como la germinación sensu stricto, mientras que en la fase III se incrementa nuevamente la incorporación de agua y ésta ocurre cuando la germinación ha finalizado y comienza el establecimiento de la plántula. En etapas tempranas de la imbibición, se produce una reactivación del metabolismo de la semilla que involucra la síntesis de novo de ADN, la movilización y degradación de ARNm y proteínas de almacenamiento, la transcripción y la traducción de nuevos ARNm y la elongación celular. Luego de la percepción de condiciones favorables de luz (Neff, 2012) y temperatura (Penfield, 2017), la germinación procede en dos pasos secuenciales que consisten en el crecimiento del embrión con ruptura de la testa y la elongación celular que dará lugar a la protrusión de la radícula, considerado como el síntoma visible de que el proceso se ha llevado a cabo con éxito.

#### 3.3.1 Rol de las mitocondrias en la germinación

La germinación es un proceso altamente demandante de energía que requiere de mitocondrias funcionales y activas, durante y posteriormente a la imbibición. Es por ello que uno de los eventos más tempranos de la germinación es la proliferación y diferenciación de las mitocondrias en un proceso complejo conocido como biogénesis mitocondrial (Czarna et al., 2016). La observación de la estructura mitocondrial en semillas secas de girasol utilizando microscopía electrónica permitió evidenciar que estas organelas presentan una morfología anormal, con una baja densidad de la matriz

y una membrana externa discontinua. Curiosamente, estas estructuras son capaces de producir pequeñas cantidades de ATP demostrando la capacidad de llevar a cabo el proceso de fosforilación oxidativa (OXPHOS). Por otra parte, estudios llevados a cabo en semillas de maíz y arroz permitieron demostrar que luego de la imbibición se incrementa la densidad de la matriz y la integridad de la membrana externa, obteniéndose mitocondrias maduras luego de 24 h de imbibición. Es por ello que se propone un mecanismo de biogénesis mitocondrial mediado por la maduración de estructuras mitocondriales básicas denominadas pro-mitocondrias, las cuales se diferencian rápidamente a mitocondrias maduras mediante un proceso que involucra un cambio en la dinámica de expresión génica, la traducción de proteínas y modificaciones post-traduccionales. Existen ciertas discrepancias en la bibliografía sobre la rapidez con la cual este proceso se lleva a cabo. Según Czarna et al. (2016), se requiere un periodo de imbibición en frío durante 24-48 h para completar la maduración mitocondrial. En cambio, Paszkiewicz et al. (2017) proponen que la reactivación mitocondrial - que se evidencia por la generación de un potencial de membrana - ocurre inmediatamente después de la imbibición, sugiriendo la presencia de mitocondrias funcionales ya en semillas secas. Según estos últimos autores, la biogénesis posterior está orientada a la especialización para el crecimiento autotrófico. Por otra parte, postulan que el incremento de la temperatura (de 4°C a 24°C) sería requerido para impulsar la dinámica mitocondrial y la generación de ATP.

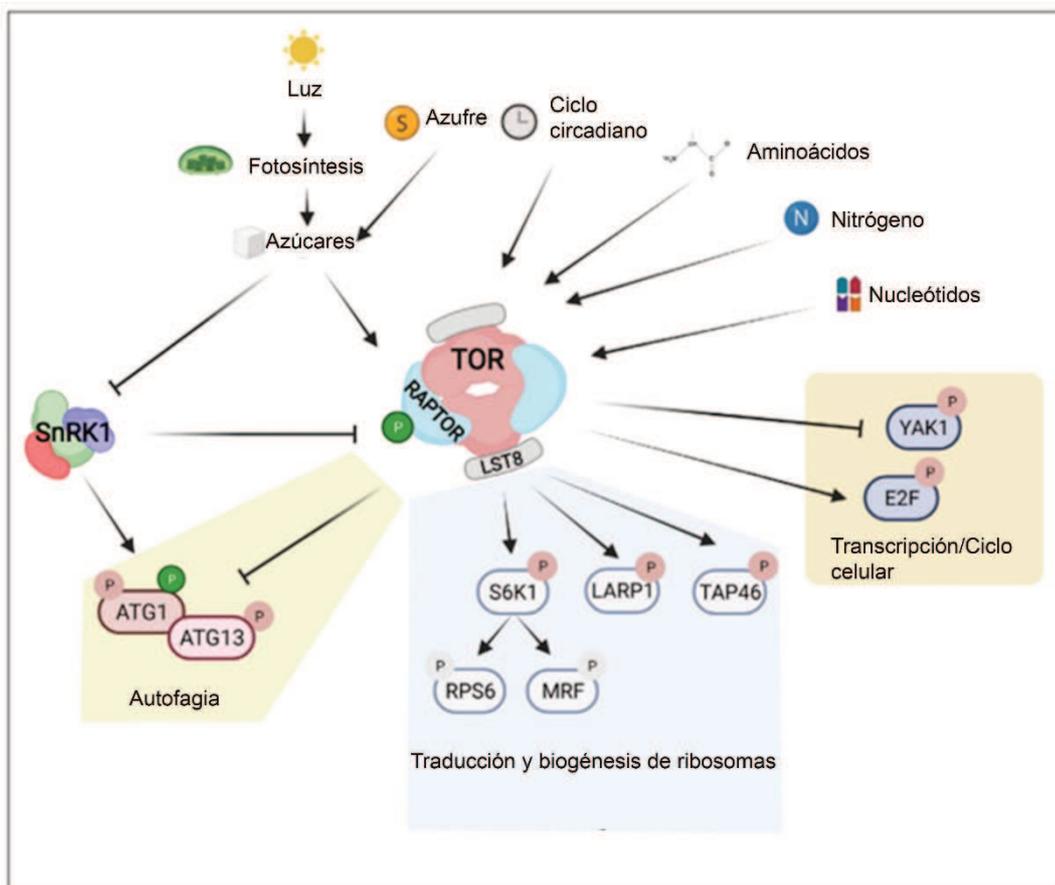
### 3.4 El complejo TOR

Los niveles de nutrientes, como los azúcares, aminoácidos, nitrógeno, azufre y fósforo, junto con el equilibrio metabólico, constituyen los reguladores centrales del crecimiento y desarrollo (Ingargiola et al., 2023; Yanlin Liu et al., 2021). En las plantas, las vías de señalización que promueven el crecimiento involucran a la Hexoquinasa 1 (HXK1) y a la quinasa *Target of Rapamycin* (TOR).

TOR es una serina/treonina quinasa altamente conservada, que pertenece a la familia de quinasas fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). A diferencia de otros eucariotas, las plantas poseen un solo complejo TOR, compuesto por la propia quinasa TOR y dos subunidades reguladoras, la proteína *Regulatory Associated Protein of TOR* (RAPTOR) y la proteína *Lethal with Sec Thirteen 8* (LST8).

En plantas, se sabe que TOR es capaz de percibir la luz y los niveles de hormonas para garantizar el crecimiento y desarrollo (G. H. Chen et al., 2018; Schepetilnikov & Ryabova, 2018) en diferentes etapas del ciclo de vida. Por un lado, promueve la biogénesis de ribosomas y la traducción de proteínas, asegurando la progresión del ciclo

celular, la activación de los meristemas de raíz y tallo, el desarrollo de órganos, la apertura de los cotiledones y el crecimiento (Dobrenel et al., 2016; Li et al., 2017; Shi et al., 2018; Van Leene et al., 2019). Por otro lado, es capaz de responder a cambios en las concentraciones de nutrientes y niveles de aminoácidos que afectan el metabolismo respiratorio y energético (Caldana et al., 2013; Cao et al., 2019; O’Leary et al., 2019). También actúa como un regulador negativo del proceso de autofagia, que se activa en condiciones de estrés, y se sabe que esta regulación es dependiente de los niveles de azúcares solubles y brasinoesteroides (Dobrenel et al., 2016; Liao et al., 2023). En la **Figura 5** se muestra un resumen de señales capaces de activar o reprimir a TOR, como también los blancos y los procesos regulados por este complejo.



**Figura 5. Representación de la relación entre el complejo TOR con diferentes vías, procesos celulares, nutrientes y señales ambientales.** La regulación de diversos procesos celulares o de señalización por el complejo TOR se lleva a cabo mediante fosforilación de proteínas blanco. Figura adaptada de Artins & Caldana (2022).

Entre los principales blancos descritos para TOR y través de los cuales regula el ciclo celular, encontramos a E2 *promoter-binding factor* A (E2FA), un factor de transcripción que es fosforilado y activado por TOR, capaz de regular la expresión de genes de la

fase S del ciclo celular, y así promover el crecimiento (Xiong et al., 2013). También se ha descubierto como blanco a la proteína *Yet Another Kinase 1* (YAK1), que en condiciones de baja actividad TOR, actúa como represor de la proliferación en células de la raíz, favoreciendo la elongación y diferenciación. En presencia de TOR, YAK1 es inhibido, y se promueve la división celular y actividad del meristema de la raíz (Barrada et al., 2019).

Dentro de los procesos que son reprimidos por TOR, encontramos la autofagia. En un contexto nutricional y energético óptimo, TOR es capaz de hiperfosforilar a la proteína *autophagy related protein 13* (ATG13) e impedir su unión con ATG1 y otras proteínas necesarias para el ensamblaje del complejo de iniciación de la autofagia (Stephan et al., 2009; Van Leene et al., 2019). Ante condiciones de estrés o déficit nutricional, esta regulación se pierde, y el proceso de autofagia se activa para funcionar como nueva fuente de energía.

Otro proceso central regulado positivamente por TOR es la traducción y la biogénesis de ribosomas. Se sabe que TOR puede regular este proceso a través de diferentes proteínas blanco. Una de ellas es *La-related protein 1* (LARP1), un regulador eucariota conservado en mamíferos, levaduras y plantas, capaz de regular la traducción de ciertos ARN mensajeros, de forma dependiente de TOR (Scarpin et al., 2020). Asimismo, el estudio de Ahn et al. (2011), ha demostrado que la proteína TAP46 es fosforilada *in vitro* por la quinasa TOR y que plantas silenciadas en TAP46 y en TOR, exhiben una traducción global reducida así como también un proceso de autofagia activo. Esto evidencia que el eje TOR-TAP46 sería otra forma de regular el proceso de traducción en plantas.

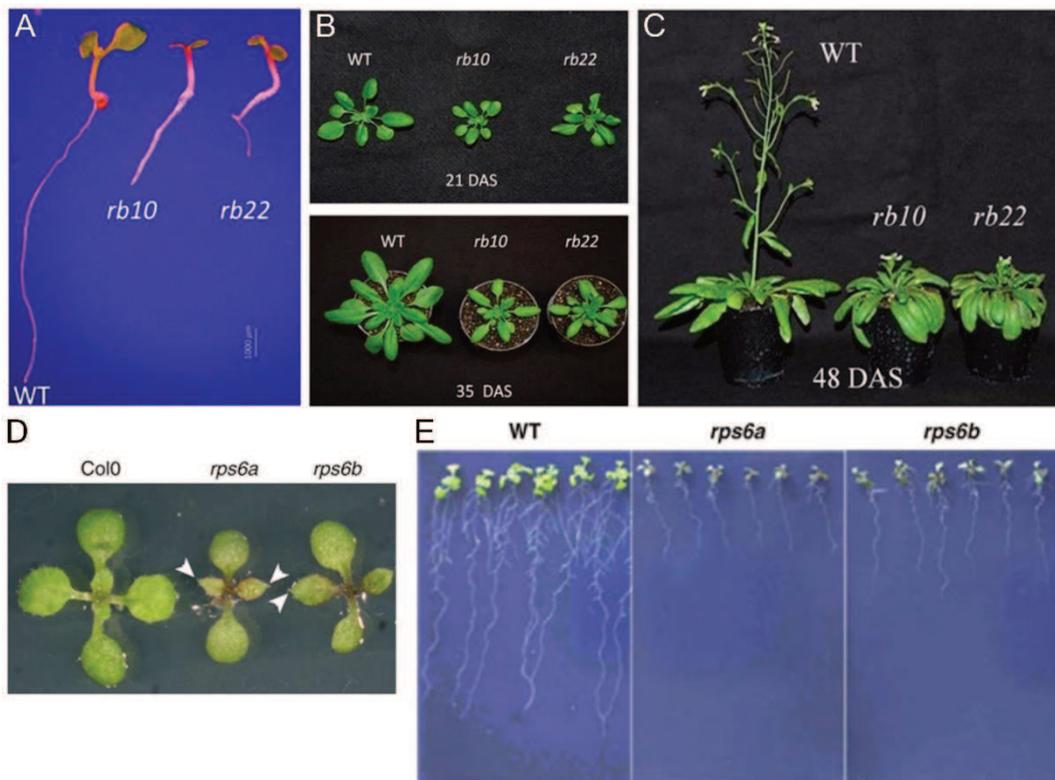
En células animales y en levaduras se sabe que TOR regula la traducción cap-dependiente, fosforilando y estimulando la actividad de la proteína *ribosomal protein S6 kinase* (S6K) (Barbet et al., 1996; Holz et al., 2021), la cual a su vez fosforila a la proteína *ribosomal protein S6* (RPS6). Esta vía de regulación de la traducción S6K-RPS6 se describió posteriormente en plantas (Deprost et al., 2007; Dobrenel et al., 2016; Xiong et al., 2013), permitiendo así confirmar un mecanismo común en los diferentes organismos eucariotas. En este sentido, tanto los niveles de fosforilación de S6K como de RPS6 se utilizan como una medida de la actividad de la vía (Dobrenel et al., 2016; Li et al., 2017; Schepetilnikov et al., 2013; Xiong et al., 2013).

Uno de los principales enfoques para estudiar la vía TOR es mediante el uso de mutantes en proteínas que forman parte del complejo o de la señalización corriente abajo. Plantas mutantes en la proteína TOR evidencian letalidad embrionaria (Deprost et al., 2007), mientras que mutaciones en otras proteína del complejo o elementos

corriente abajo de la vía, generan defectos en el crecimiento pero no letalidad, lo que ha facilitado su estudio.

En estudios previos, se han caracterizado fenotípicamente líneas mutantes *raptor* y *rps6* (**Figura 6**). En *A. thaliana*, RPTOR se encuentra codificada por dos genes, *RPTOR1A* y *RPTOR1B*. La mutante *RPTOR1A* no genera un cambio evidente en el fenotipo, mientras que la mutante *RPTOR1B* presenta defectos considerables en la germinación, el crecimiento y desarrollo, aunque no son letales (Salem et al., 2017). En cuanto a la línea *raptor1b*, se ha informado un notable retraso y reducción en el crecimiento, una menor longitud de raíz en plántulas, menor área de roseta y un retraso en la transición de estadio vegetativo a reproductivo (Salem et al., 2018).

Por otra parte, la proteína RPS6 se encuentra codificada por dos genes. *RPS6A* y *RPS6B*. Los fenotipos de dichas líneas se caracterizan por tener raíces más cortas en plántulas y rosetas más pequeñas, comparadas con el control WT (Creff et al., 2010).



**Figura 6. Imágenes representativas de los fenotipos reportados para mutantes *raptor1b* y *rps6a/b*.** Fenotipo de plántulas de 12 días de edad (**A**), tamaño de roseta de plantas de 21 y 35 días (**B**) y altura de tallos de plantas de 48 días (**C**), de los genotipos WT y *raptor1b*. (**D**) Parte aérea de plántulas WT, *rps6a* y *rps6b* de 10 días. (**E**) Fenotipo de raíz de plantas de 10 días de los genotipos mencionados en (D). Imágenes adaptadas de Creff et al. (2010) y Salem et al. (2018).

### 3.4.1 Conexión con la vía SnRK1

Existe una gran interconexión de la vía TOR con otras vías involucradas en el crecimiento, que permiten regular de forma coordinada los diferentes procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, para poder alcanzar así un equilibrio entre las distintas vías metabólicas. Una de ellas es la quinasa *Sucrose non-fermenting-related Kinase 1* (SnRK1), que se activa en condiciones de estrés o falta de nutrientes (Baena-González et al., 2007; Baena-González & Sheen, 2008). Aún no está claro cuáles son los reguladores corriente arriba de esta quinasa, pero se ha propuesto que la Trehalosa 6 fosfato (T6P) juega un rol fundamental en la inhibición de la misma en condiciones nutricionales óptimas (Y. Zhang et al., 2009). Si bien no está claro el mecanismo por el cual la T6P ejerce esta inhibición, se cree que podría ser a través de la interrupción de la interacción entre SnRK1 y las quinasas *geminivirus Rep-interacting kinases* (GRIKs) que fosforilan y activan SnRK1 (Adamo et al., 2014; Shen et al., 2009; Zhai et al., 2018). Respecto a los procesos regulados por SnRK1, sabemos que induce genes relacionados con la removilización de nutrientes, a través de la degradación de la pared celular, almidón, proteínas y lípidos, así como también induce la autofagia y gluconeogénesis, mientras que reprime genes relacionados con la síntesis de proteínas, el ciclo de Krebs y la glucólisis (Baena-González et al., 2007; Baena-González & Sheen, 2008). Se ha descrito también, que SnRK1 fosforila e inactiva enzimas claves que participan de distintas vías metabólicas, como por ejemplo en la biosíntesis de isoprenoides (3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa, HMGR) (Robertlee et al., 2017), en la síntesis de sacarosa (sacarosa fosfato sintasa, SPS) (McMichael et al., 1995) y en la asimilación de nitrógeno (nitrato reductasa, NR) (MacKintosh, 1992). Es importante destacar que SnRK1 orquesta una amplia reprogramación transcripcional para recuperar la homeostasis energética, mediante la regulación negativa de vías anabólicas y la regulación positiva de vías catabólicas (Baena-González et al., 2007; Baena-González & Sheen, 2008).

Dado el rol antagónico que ejercen TOR y SnRK1 sobre el crecimiento en función de la disponibilidad de energía, se ha demostrado mediante ensayos *in vitro* en plantas, que SnRK1 es capaz de fosforilar a RAPTOR, y así inhibir la vía TOR en condiciones de estrés (Nukarinen et al., 2016), algo que había sido previamente demostrado en células animales (Gwinn et al., 2008). De manera inversa, se reportó para levaduras y células animales, que TOR es capaz de fosforilar e inhibir a *AMP-activated protein kinase* (AMPK, homólogo de SnRK1 en mamíferos) en condiciones de hambre o “*starvation*”, como es más conocido en inglés (Ling et al., 2020). Esto demuestra la

existencia de un circuito o “loop” de regulación negativa entre estas dos vías, que permite coordinar el crecimiento en eucariotas en función de la disponibilidad energética. En plantas no se ha demostrado la regulación directa de TOR sobre SnRK1, pero sí se ha sugerido que esta inhibición podría estar mediada por la proteína *FCS-like zinc finger 14* (FLZ14) (Artins et al., 2023). Otros autores, demuestran que la señalización azúcares-TOR promueve la actividad de la proteína FLZ8, la cual es capaz de activar a SnRK1, para finalmente promover la interacción SnRK1-RAPTOR, y así limitar la actividad TOR, de manera de lograr un equilibrio entre el crecimiento y la respuesta a estrés (Jamsheer et al., 2022).

### 3.5 La autofagia como proceso celular esencial

La autofagia es un proceso celular que involucra la degradación de macromoléculas, organelas o componentes celulares dañados, con el fin de obtener nutrientes y energía, necesarios para el desarrollo, en respuesta a estrés o durante la senescencia. De acuerdo con los componentes a eliminar o reciclar hacia la vacuola, y el mecanismo que se desencadena, el proceso de autofagia en plantas puede ser dividido en 2 clases: macroautofagia y microautofagia (X. Yang & Bassham, 2015).

El proceso de microautofagia consiste en la formación de una vesícula intravacuolar por la invaginación del tonoplasto, donde ingresarán aquellos componentes del citosol a ser degradados (Bassham, 2007). Por otra parte, el proceso de macroautofagia, involucra la formación de una vesícula doble membrana en el citosol, denominada autofagosoma, el cual luego se fusionará con la vacuola (Signorelli et al., 2019).

En *A. thaliana* se han descubierto y caracterizado genes denominados *ATG* (*autophagy related genes*) que codifican proteínas con diversas funciones, que son esenciales durante el proceso de formación del autofagosoma. Se conocen 4 etapas involucradas en la formación del autofagosoma: iniciación (1), nucleación de la membrana y formación del fagóforo (2), ingreso de los componentes citosólicos al autofagosoma (3) y fusión seguida de degradación en la vacuola (4). En la **Figura 7**, se esquematizan las proteínas ATG necesarias en cada uno de estos pasos.



formación del complejo ATG1-ATG13, que desencadena la formación del autofagosoma (L. Chen et al., 2017).

En base a lo desarrollado previamente, resulta interesante el estudio de la relación entre la función mitocondrial mediada por el Citocromo c con la vía TOR, bajo el fundamento de que líneas mutantes en *CYTc-1*, así como en proteínas de la vía TOR (RAPTOR y RPS6), presentan fenotipos similares como: raíces más cortas, rosetas más pequeñas, retraso en la transición a estadio reproductivo, desbalance metabólico, entre otros. Al mismo tiempo, las funciones desempeñadas por cada vía podrían estar conectadas ya que el CYTc se encuentra involucrado en la obtención de energía (vía de la fosforilación oxidativa) por lo que regula el estado energético de la célula, y la vía TOR es precisamente un sensor del estado energético de la célula, entre otras funciones.

#### 4. Objetivos

- i. Analizar el impacto de la disminución del CYTc en el metabolismo de plantas de *Arabidopsis thaliana*.
- ii. Analizar el impacto de la disminución del CYTc en la germinación y el crecimiento de plantas de *Arabidopsis thaliana*.
- iii. Analizar el impacto de la disminución del CYTc en plantas con las vías de señalización TOR y SnRK1 alteradas.
- iv. Analizar una posible regulación de la biogénesis mitocondrial y la respiración por la vía TOR y SnRK1.
- v. Evaluar el efecto de aumentar los niveles de la proteína TOR, en plantas con menores niveles de CYTc.
- vi. Evaluar el proceso de autofagia en plantas con menores niveles de CYTc.
- vii. Caracterizar el crecimiento de líneas de plantas que presentan alteraciones en el proceso de autofagia.
- viii. Evaluar el impacto de afectar el proceso de autofagia en plantas con menores niveles de CYTc, mediante la obtención de líneas de cruces.

## 5. Materiales y Métodos

### 5.1 Materiales

#### 5.1.1 Material vegetal

Las plantas utilizadas en este trabajo de tesis pertenecen al ecotipo Columbia de *A. thaliana* (Col-0). En el trabajo de Welchen et al. (2012) se identificaron mutantes por inserción de T-DNA en el gen *CYTC-1* (At1g22840), denominadas *cytc-1a* (GK586B10) y *cytc-1b* (SALK\_143142). Además, se utilizó una línea que sobreexpresa CYTc-1 (oeCYTc), la cual se obtuvo y fue descrita previamente por Racca et al. (2018). Se obtuvieron del *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC, Universidad Estatal de Ohio, EE.UU.) plantas mutantes en los genes *ATG5* (At5g17290; SAIL\_129\_B07) y *ATG7* (At5g45900; GABI\_655\_B06), mutantes en la vía TOR; *raptor* (At3g08850; SALK\_078159), *rps6b* (At5g10360; SALK\_012147C) y *lst8* (At3g18140; SALK\_012147C), y mutantes en la vía SnRK1; *akin10* (GABI579E09) y *akin10-2* (SALKseq\_093965). La Dra. Jen Sheen (*Department of Genetics, Harvard Medical School, USA*) nos envió amablemente la línea de *A. thaliana* que sobreexpresa S6K (At3g08730; 35S::S6K-HA) fusionada a la etiqueta de hemaglutinina (HA), y La Dra. Lyuba Ryabova (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Estrasburgo, Francia) nos facilitó la línea que sobreexpresa la proteína TOR (At1g50030), fusionada a GFP (35S::GFP-TOR) (Schepetilnikov et al., 2017). Por último, el Dr. Pablo Manavella (IAL, CONICET, UNL) nos cedió semillas de la línea sobreexpresante de ATG8a (At4g21980), fusionada a GFP (35S::GFP-ATG8a) (Ré et al., 2020; Thompson et al., 2005).

#### 5.1.2 Medio de cultivo para el crecimiento de *A. thaliana*

Para el crecimiento en placas se empleó el medio comercial *Murashige y Skoog* (MS) basal suplementado con vitaminas M519 de *PhytoTechnology Laboratories*, preparado acorde a las indicaciones del fabricante. En los medios sólidos se adicionó agar en una proporción de una proporción de 1% (p/v).

**Tabla 1.** Detalle de los oligonucleótidos utilizados para RT-qPCR.

<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia 5' -&gt; 3'</b>	<b>Descripción</b>
qTOR_F	GGGCGTGATTTTTCTTCGTCTGC	Amplificación del ADNc de <i>TOR</i>
qTOR_R	CCAGAAAGGGCACCACCCAAC	
qRaptor_F	TCGGCCTCATCAGAAAGTTGAAAG	Amplificación del ADNc de <i>RAPTOR-1</i>
qRaptor_R	TGTGATGCACTCACCACCTTTG	
qLst8_F	GTTTGGGACTGCGTCTTCTC	Amplificación del ADNc de <i>LST8-1</i>
qLst8_R	CTTATTAAGGTTTTAATCGTGA	
qRps6_F	CTTCTGCTCCTGCTAAACCC	Amplificación del ADNc de <i>RPS6-B</i>
qRps6_R	CGTTCTCATGTCTGTGGAGC	
qS6K1_F	TGCAATACTGAAAGGGCTGCTG	Amplificación del ADNc de <i>S6K-1</i>
qS6K1_R	TTATCTCCTCTGCTCCGCTCAG	
CYTca-qRT F	CGGTCACAAACAAGGACCCAATC	Amplificación del ADNc de <i>CYTc-1</i>
CYTca-qRT R	ACCAGCAGTTGTACCAGATTGTC	
CYTcb-qRT F	GTTGAATCCTAAGAAGTACATCCCT	Amplificación del ADNc de <i>CYTc-2</i>
CYTcb-qRT R	ATATAGACCTGCTCGGACAGATT	
qRTACT-F	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	Amplificación del ADNc de <i>ACTINA</i>
qRTACT-R	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC	
AOX1a-qRTF	AGCATCATGTTCCAACGACGTTTC	Amplificación del ADNc de <i>AOX1a</i>
AOX1a-qRTR	GCTCGACATCCATATCTCCTCTGG	
AOX1d-qRTF	CGATTACTGGCGGTTGCCTA	Amplificación del ADNc de <i>AOX1d</i>
AOX1d-qRTR	ATAGGAGCCGGAGCTTCCTT	
AOX2-qRTF	CCGCGCCCGCGATTGCTATT	Amplificación del ADNc de <i>AOX2</i>
AOX2-qRTR	TCGGAGCTGCTGCTTCTCGCA	
ANAC013-qRTF	CCTGAGGAATTACCTGAGAAAGCG	Amplificación del ADNc de <i>ANAC013</i>
ANAC013-qRTR	CCAATAGCCACGTTTCAGTAGCTC	

ANAC017-qRTF	GGTTCGAGGATGATCAGGCCA	Amplificación del ADNc de <i>ANAC017</i>
ANAC017-qRTR	TGGCCTTGGGCATTACACT	
CDKE1-qRTF	ACAAGCATCAATCCGCCTCA	Amplificación del ADNc de <i>CDKE1</i>
CDKE1-qRTR	TGCCTGTGCCGGGAAATTAT	
UGT74E2-qRTF	TTTCCCTTCGTTCCCGATGCTG	Amplificación del ADNc de <i>UGT74E2</i>
UGT74E2-qRTR	TTCGGGTATGAGGACGATTTCGC	
TIM23-qRTF	TGGGTTGATCTACGCAGGGATTG	Amplificación del ADNc de <i>TIM23</i>
TIM23-qRTR	CAGCGACAACACTGGTCCAAAC	

**Tabla 2.** Detalle de los oligonucleótidos utilizados para PCR.

Oligonucleótido	Secuencia 5' -> 3'	Descripción
Lbb1.3	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC	Amplificación de alelo mutante en línea SALKseq_093965 ( <i>akin10-2</i> ).
T-DNA GK	ATATTGACCATCATACTCATTGC	Amplificación de alelo mutante en línea GABI579E09 ( <i>akin10</i> ).
akin10 LP	CCTCTAGTGGTTATCTCGGG	Amplificación de una porción del gen <i>KIN10</i>
akin10 RP	AAAATCAATCTTGGTGGCATG	
akin10-2 LP	TGAGCAACATAATGCGAGATG	Amplificación de una porción del gen <i>KIN10</i>
akin10-2 RP	GAAGTCCAAGAGCCCATTTTC	

## 5.2 Métodos

### 5.2.1 Condiciones de crecimiento en cámara de cultivo

Las plantas crecidas en tierra fueron cultivadas en macetas de 8 cm de diámetro y 7 cm de altura, a una temperatura de 23°C y una intensidad lumínica aproximada de 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . El ciclo de luz/oscuridad se mantuvo en fotoperiodo de día largo (LD) con 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

Para el cultivo de plántulas en placas, las semillas fueron desinfectadas con una solución de etanol 70% (v/v) durante 5 minutos y posteriormente con una solución de lavandina 1% (v/v) y SDS 0,1% (p/v) durante 15 minutos. Finalmente, fueron lavadas 3 veces con agua destilada estéril y se mantuvieron a 4°C durante 4 días, para luego ser sembradas en las respectivas placas. El ciclo de luz/oscuridad se mantuvo en fotoperiodo LD.

Para los tratamientos con inhibidores y los análisis por *Western Blot*, las plántulas se cultivaron según Li et al. (2017) y Xiong et al. (2013). Brevemente, se crecieron durante 3,5 días en medio MS líquido, en fotoperiodo LD, seguido de una noche prolongada para el agotamiento de nutrientes (16 h), y luego fueron tratadas con glucosa o sacarosa 20 mM, por diferentes períodos de tiempo, indicados en cada figura.

### **5.2.2 Análisis de la longitud de la raíz**

Para estudiar el crecimiento de raíces, las plántulas fueron crecidas en placas de plástico cuadradas de 12x12 cm, dispuestas en posición vertical durante el período indicado en cada figura, en condiciones de LD. En los casos en los que se analizó el efecto de la sacarosa, ésta se adicionó en una concentración de 1% (p/v), y para el caso del efecto de la glucosa se adicionó en medio líquido en una concentración de 20 mM. La longitud de las raíces fue determinada mediante el análisis de fotografías con el *software Fiji*.

### **5.2.3 Análisis fenotípico del tejido aéreo**

La caracterización fenotípica de la porción aérea de las plantas fue realizada utilizando entre 8 y 12 plantas por cada genotipo. Se analizaron los parámetros de área de roseta (17 días posteriores a la siembra) y tiempo de floración (considerando el día de floración cuando el botón floral alcanza 0,5 cm). Se tomaron fotografías para evaluaciones cualitativas y posteriores medidas cuantitativas, empleando el *software Fiji*.

### **5.2.4 Ensayos de germinación**

Para la comparación de la tasa de germinación se tuvo especial cuidado de que las semillas de todos los genotipos estudiados pertenecieran al mismo lote, es decir que las plantas que originaron dichas semillas fueron cultivadas al mismo tiempo y en idénticas condiciones. Setenta semillas de cada línea fueron esterilizadas y sembradas en una placa de Petri con medio MS-agar. Luego de una incubación a 4°C en oscuridad durante tres días, las semillas fueron expuestas a luz en un fotoperiodo de LD. Cada experimento fue llevado a cabo tres veces, utilizando tres lotes independientes.

### 5.2.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de ADN para el análisis de las mutantes insercionales y líneas transgénicas se llevó a cabo mediante PCR. Cada reacción estaba compuesta por: solución *buffer* 1x; dNTPs 0,2 mM; MgCl<sub>2</sub> 2 mM; oligonucleótidos específicos 500 ng y 1,5 U de *Taq* (*Thermus Aquaticus*) ADN polimerasa (PB-L Productos Bio-Lógicos). Finalmente se adicionó el ADN molde respectivo, utilizando volúmenes finales de reacción de 15 µl. Se empleó el termociclador PxE 0,2 *Thermal Cyclers* (*Thermo Electron Corporation*), configurando los correspondientes programas y estableciendo la temperatura de hibridación de acuerdo con la secuencia de los oligonucleótidos utilizados. Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa y se visualizaron con luz UV.

Las fórmulas empleadas para los cálculos fueron:

$$T_a = T_m - 5^\circ\text{C} ; T_m = 2(A+T) + 4(G+C).$$

**Tabla 3.** Programa empleado para PCR.

	Temperatura (°C)	Tiempo	N° ciclos
Desnaturalización inicial ADN genómico	94	5 minutos	1
Desnaturalización fragmento	94	30 segundos	35
Anillado	Según fórmula para cada oligonucleótido	30 segundos	35
Extensión	72	Según tamaño de cada fragmento a amplificar teniendo en cuenta procesividad de <i>Taq</i> ADN polimerasa de 1000 pb/min	35
Extensión final	72	10	1

### 5.2.6 Ensayo de privación de nutrientes o “hambre”

Las plántulas se cultivaron durante 3,5 días en medio MS líquido, seguido de una noche prolongada para el agotamiento de nutrientes (16 h), y luego se trataron durante 3 días con sacarosa 20 mM, para inducir el crecimiento. Posterior a esto, la mitad de las plantas se mantuvieron en sacarosa (muestras para la condición de crecimiento óptima) y la otra mitad se colocó en oscuridad sin sacarosa, para inducir el hambre. Posteriormente,

se colectaron las muestras para medir el contenido de clorofila, como parámetro de sensibilidad al estrés por falta de carbono, a los tiempos indicados en cada figura.

### 5.2.7 Tratamientos con inhibidores

Para inducir la inhibición mitocondrial, las plántulas se cultivaron en medio líquido como se indicó previamente. Se trataron con el agente desacoplante 2-4 dinitrofenol (2-4 DNF) a una concentración final de 1  $\mu\text{M}$  durante 48 h, y antimicina-A (AMA) 5  $\mu\text{M}$  por 24 h. Los ensayos de inhibición de la vía TOR en plántulas se realizaron con el agente AZD-8055 a una concentración de 0,5  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$ , durante 48 h.

### 5.2.8 Tinción de raíces y microscopía confocal

Se utilizó a línea reportera 35S::GFP-ATG8a para el análisis de autofagia mediante microscopía confocal. Las longitudes de onda de excitación y detección se establecieron en 488 nm y 498-531 nm, respectivamente. Las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio confocal Leica TCS SP8 con objetivo de 20x. A partir de estas imágenes se cuantificó el número de autofagosomas con el *software Fiji*. Todas las imágenes fueron capturadas en la capa más externa de la raíz. Alternativamente, las raíces se tiñeron con *LysoTracker™ Green DND-26* 1  $\mu\text{M}$  (*Invitrogen*) durante 15 minutos y luego se lavaron dos veces durante 5 minutos con agua destilada. La fluorescencia de *LysoTracker* se analizó utilizando los mismos parámetros de excitación y detección descritos para la línea 35S::GFP-ATG8a. Se utilizó la sonda tetrametilrodamina metil éster (TMRM; 1  $\mu\text{M}$ ) para evaluar el potencial de membrana mitocondrial. Como control de la masa/número mitocondrial total se utilizó *MitoTracker™ Green FM* (*Invitrogen*) en la misma concentración. Las raíces se tiñeron durante 20 minutos, y luego lavadas con agua destilada durante 5 minutos. Las longitudes de onda de excitación y detección fueron 488 nm/498-531 nm para *MitoTracker* y 552 nm/590-620 nm para TMRM. Las imágenes se adquirieron con el objetivo de inmersión de 63x. Para la cuantificación se utilizó el parámetro "*mean gray value*" (intensidad de fluorescencia media por unidad de área de raíz) calculado por el *software* de *Fiji*.

### 5.2.9 Mediciones de ATP

Los adenilatos se extrajeron según describió Raveneau et al. (2017). Brevemente, se homogeneizaron 50 mg de plántulas disgregadas en nitrógeno líquido, con 400  $\mu\text{l}$  de metanol:cloroformo (1:1) y se generó la separación de fases añadiendo 250  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . Después de la centrifugación, la fase acuosa se usó para la cuantificación de adenilatos mediante HPLC, de acuerdo a Menegollo et al. (2019). Se inyectaron las muestras (10

μl) en una columna Luna Omega C18 (*Phenomenex, Torrance, CA, EE. UU.*, tamaño de partícula de 3 μm, 150 x 4,6 mm) equipada con un cartucho *PS C18 SecurityGuard* (*Phenomenex*) y conectada al equipo *LC Prominence-i-2030C Plus* (*Shimadzu, Kioto, Japón*). La separación se realizó a 30°C con un caudal de 0,75 ml min<sup>-1</sup> y una fase móvil de NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M, pH 6,0 y metanol al 1% (v/v). El pico correspondiente al ATP se identificó añadiendo un estándar (*Sigma-Aldrich*). La cuantificación se realizó con una curva estándar de concentraciones conocidas y el *software LabSolutions Lite* (*Shimadzu*) utilizando la absorbancia a 254 nm.

#### **5.2.10 Extracción y determinación de clorofila, azúcares solubles y aminoácidos totales**

Se utilizó un total de 20 mg de plántulas frescas para determinar el contenido de clorofilas, azúcares solubles (glucosa, sacarosa, fructosa) y aminoácidos. Las muestras fueron recolectadas en tubos plásticos, congeladas y disgregadas en nitrógeno líquido. La extracción se realizó homogeneizando el tejido con 250 μl de etanol al 80% en HEPES-KOH 10 mM (pH 7,0) e incubándolo durante 20 minutos a 80°C. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos. El sobrenadante resultante se transfirió cuidadosamente a un tubo nuevo (S1), mientras que el pellet se resuspendió en 250 μl de etanol al 50 % en HEPES-KOH 10 mM (pH 7,0). Luego se incubó esta resuspensión a 80°C y se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido (S2) se combinó con S1. A continuación, el pellet se resuspendió en 150 μl de etanol al 80 % en HEPES-KOH 10 mM (pH 7,0), seguido de incubación a 80 °C y centrifugación a 12000 g durante 10 minutos. El sobrenadante resultante (S3) se añadió a los sobrenadantes S1 y S2 ya combinados y se usó una alícuota para determinar los diferentes metabolitos. El pellet se guardó para la cuantificación del contenido de almidón.

El contenido de clorofila total se determinó midiendo la absorbancia a 645 y 665 nm en una placa de 96 pocillos, a partir de 50 μl del extracto etanólico diluido con 120 μl de etanol absoluto. Para el cálculo utilizamos la siguiente fórmula:

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g/pocillo}) = 5,48_{A665} - 2,16_{A645}$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g/pocillo}) = 9,67_{A645} - 3,04_{A665}$$

El contenido de azúcares solubles se determinó a partir de una alícuota del extracto etanólico, con un método enzimático siguiendo el protocolo desarrollado por Stitt et al. (1989).

El contenido total de aminoácidos se determinó mediante un método de fluorescencia con el reactivo fluorescamina (F9015, Sigma) y se cuantificó utilizando una curva estándar de glutamato. El protocolo fue descrito por Bantan-Polak et al. (2001), con longitudes de onda de excitación y emisión establecidas en 405 nm y 485 nm, respectivamente.

#### **5.2.11 Cuantificación de almidón**

El pellet obtenido en la extracción etanólica se trató con amiloglucosidasa y  $\alpha$ -amilasa para hidrolizar el almidón. El contenido de almidón se cuantificó con un método enzimático según Hendriks et al. (2003).

#### **5.2.12 Cuantificación de aminoácidos por HPLC**

El perfil de aminoácidos se cuantificó mediante HPLC utilizando el extracto etanólico descrito en la sección anterior. Las muestras (1  $\mu$ l) se inyectaron en una columna Luna Omega C18 (Phenomenex, Torrance, CA, EE. UU., tamaño de partícula 3  $\mu$ m, 150 x 4,6 mm) equipada con un cartucho *PS C18 SecurityGuard* (Phenomenex) y conectada al equipo *Prominence-i LC- 2030C Plus* (Shimadzu, Kioto, Japón). El método de co-inyección se aplicó utilizando los reactivos o-ftaldialdehído (OPA) y ácido mercaptopropiónico (MPA) para generar los compuestos derivados, con longitudes de onda de excitación y emisión establecidas en 350 nm y 450 nm, respectivamente. La separación se realizó a 40°C con un caudal de 0,75 ml min<sup>-1</sup>, utilizando una fase móvil A (dihidrogenofosfato de potasio 15 mM/hidrogenofosfato dipotásico 5 mM) y una fase móvil B (agua:acetonitrilo:metanol 15:45:40). El pico correspondiente a cada aminoácido se identificó utilizando una solución estándar con concentraciones conocidas de cada uno de ellos (A2161, Sigma). La cuantificación se realizó con una curva estándar de concentraciones conocidas y el *software LabSolutions Lite* (Shimadzu).

#### **5.2.13 Extracción de ARN y análisis de expresión génica**

La extracción de ARN y el análisis de expresión génica se realizaron según Welchen et al. (2012). Los niveles de transcritos se midieron mediante transcripción reversa seguida de una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR) de ARN

total tejido específico. Las muestras se colectaron, luego se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. El ARN total se preparó utilizando el reactivo TRIzol seguido de un paso de precipitación con LiCl. La transcripción reversa se realizó con  $1,5\ \mu\text{g}$  de ARN, utilizando un cebador oligo(dT)<sub>18</sub> y transcriptasa reversa (*ThermoFisher*). La qPCR se realizó sobre una alícuota del ADNc utilizando cebadores específicos para el gen de interés (Tabla 1) y *SYBR Green* como fluoróforo, en un aparato *Bio-Rad CFX96*. Los niveles relativos de expresión se determinaron utilizando el método de Ct comparativo en tres muestras biológicas independientes y con el gen de actina como normalizador, según describió Charrier et al. (2002).

#### **5.2.14 Análisis de Western Blot**

Se utilizaron 50 mg de tejido fresco para extraer las proteínas totales. Las muestras se recogieron en tubos Eppendorf y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Posteriormente, se disgregó el tejido y se extrajeron las proteínas utilizando  $75\ \mu\text{l}$  de buffer Laemmli 2x suplementado con inhibidor de fosfatasa 1X (*PhosSTOP*<sup>™</sup>, Roche), inhibidor de proteasa (*cOmplete*<sup>™</sup>, Roche) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)  $0,2\ \text{mM}$ . Las proteínas se desnaturalizaron a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos y luego se centrifugaron a  $12000\ \text{g}$  durante 10 minutos. Posteriormente, se separaron  $10\ \mu\text{l}$  del sobrenadante en un gel de SDS-PAGE al 10 % y se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF). Luego se bloqueó la membrana de PVDF utilizando una solución de leche al 5%, diluida en solución salina (Tris-HCl  $50\ \text{mM}$  pH 8,0; NaCl  $150\ \text{mM}$ ; Tween 20  $0,1\%$ ) (TBS-T  $0,1\%$ ). Se utilizaron los anticuerpos primarios anti-S6K (1:1000, S6K1/2, Agrisera #AS121855), anti-P S6K (1:1500, S6K1/2-P, Agrisera #AS132664), anti-Actina (1:10000, ACT, Agrisera #AS132640), anti-GFP (1:5000, Agrisera #AS152987) y anti-CYTc (1:2000, Agrisera #AS08343A). Como anticuerpo secundario se utilizó un anti inmunoglobulina de conejo conjugado la peroxidasa de rábano picante (HRP; 1:50000). El anticuerpo primario anti-HA (1:10000, Roche 11867423001) se detectó utilizando el anticuerpo secundario anti inmunoglobulina de rata conjugado con HRP (1:20000). El tiempo de incubación tanto para el bloqueo como para los anticuerpos fue de una hora, con lavados de 10 minutos con TBS-T  $0,1\%$  entre cada paso. Los anticuerpos y la solución de bloqueo se diluyeron en TBS-T  $0,1\%$  y leche  $1\%$ .

### **5.2.15 Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados usando ANOVA unidireccional y bidireccional (prueba post hoc de Tukey o Sidak). Las comparaciones entre dos poblaciones se realizaron mediante la prueba T. Estos análisis se realizaron con el *software GraphPad Prism 6*.

## 6. Resultados

### 6.1 Estudio de mutantes deficientes en CYTc

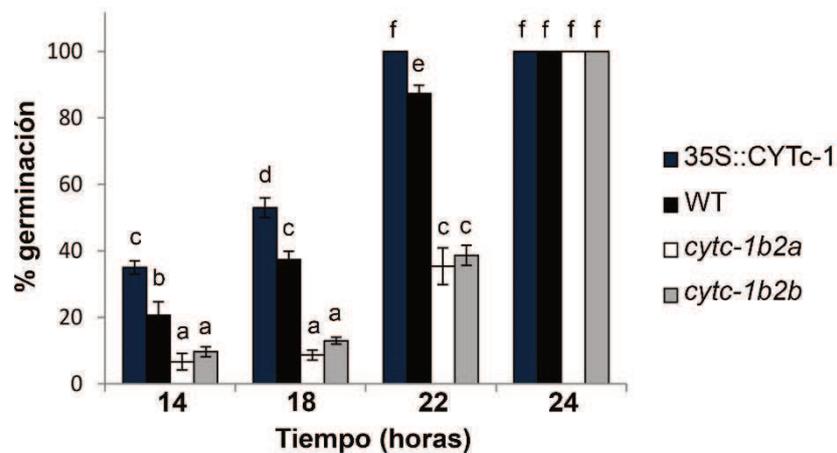
#### 6.1.1 Análisis del proceso de germinación

La germinación es un proceso crucial para la supervivencia de las especies vegetales mediante el cual se desencadenan una serie de eventos en la semilla que provocan el crecimiento del embrión, la ruptura de la cubierta y el establecimiento de una nueva plántula, cuando las condiciones ambientales son óptimas para garantizar el desarrollo. Este evento es altamente dependiente de energía (Czarna et al., 2016; Paszkiewicz et al., 2017) y a su vez está regulado por la acción antagónica de hormonas como las GA y el ácido abscísico (ABA), las que actúan promoviendo e inhibiendo la germinación, respectivamente (Shu et al., 2016). Es por ello que la semilla constituye un escenario ideal para continuar con el estudio de la relación entre la vía dependiente del CYTc y las vías hormonales en la regulación del crecimiento y el desarrollo vegetal.

En el laboratorio se han obtenido y caracterizado mutantes insercionales dobles (*cytc-1b2a* y *cytc-1b2b*) para el gen CYTc. Luego de un análisis exhaustivo se observó que estas plantas presentan un marcado retraso en el crecimiento, evidenciado por una menor biomasa de roseta, así como un retraso en el momento de floración. Por otra parte, se ha visto que estas plantas presentan una alteración metabólica y hormonal, ya que poseen mayor acumulación de almidón y azúcares solubles, y un menor contenido de giberelinas activas, en comparación con plantas salvajes (Racca et al., 2018).

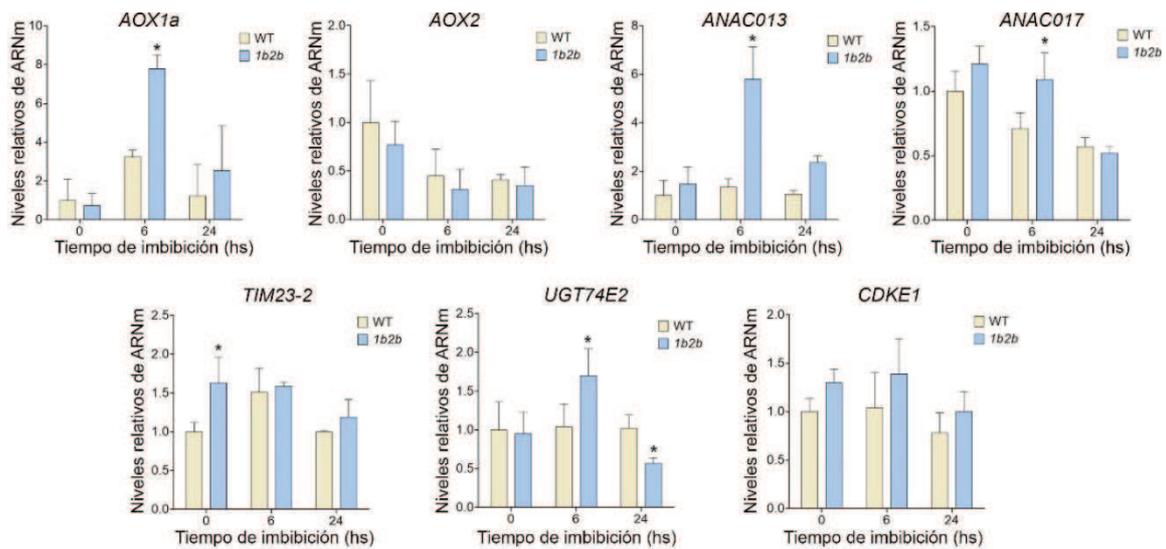
Para poder determinar si una disminución en los niveles de CYTc estaba afectando el proceso de germinación, realizamos ensayos en los que se midió el tiempo de germinación luego de un período de incubación en medio MS agar y condiciones germinativas (fotoperiodo LD, 24°C), utilizando líneas mutantes *cytc-1b2a* y *cytc-1b2b*, la línea sobreexpresante 35S::CYTc-1 y el control WT. Previo a la exposición a la luz las semillas fueron incubadas a 4°C en oscuridad durante tres días. Como se observa en la **Figura 8**, las mutantes deficientes en CYTc presentaron una menor velocidad de germinación que plantas WT, mientras que las semillas sobreexpresantes, por el contrario, mostraron una aceleración en el proceso. Luego de 18 h de exposición a condiciones germinativas, las semillas 35S::CYTc germinaron en un 100%, a diferencia de semillas WT y mutantes, cuyos porcentajes fueron 70% y 50% respectivamente. A las 24 h, las diferencias entre WT y sobreexpresantes desaparecieron, mientras que las mutantes aún presentaban un menor porcentaje de germinación (60%). Recién a las 48 h se observó la germinación completa de todos los genotipos. Estos resultados permiten

concluir que una alteración en los niveles de CYTC impacta en la velocidad de germinación.



**Figura 8. Evaluación del proceso de germinación de semillas mutantes dobles y sobreexpresantes de CYTc-1.** Las barras representan el valor promedio y desviación estándar del % de germinación de tres ensayos diferentes realizados con lotes de semillas independientes. Dentro de cada ensayo se utilizaron 70 semillas de cada genotipo. La abscisa corresponde al número de h (14, 18, 22 y 24 h) incubadas en la cámara de cultivo (LD). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $n=3$  ensayos independientes,  $p<0,01$ ).

La inhibición química de la respiración dependiente de CYTc conduce a la inducción de la respuesta retrógrada mitocondrial (MRR) que afecta la expresión de un grupo de genes nucleares (Ng et al., 2014). Para corroborarlo medimos los niveles de transcripto de varios genes involucrados en esta respuesta, en semillas secas y durante la estratificación para analizar los posibles efectos de la deficiencia de CYTc. En la **Figura 9** vemos una inducción de *AOX1a*, un marcador canónico de MRR, y de *ANAC013*, un inductor de la expresión de *AOX1a* durante la MRR (De Clercq et al., 2013), luego de 6 h de estratificación de las semillas. No se observaron cambios, o sólo cambios muy sutiles en otros genes relacionados con la MRR, como *TIM23-2*, *UGT74E2*, *CDKE1* y *ANAC017*. Por su parte *AOX2*, que se expresa preferentemente en semillas secas, tampoco mostró diferencias con respecto al control WT. Estos resultados sugieren que la deficiencia de CYTc provoca una activación parcial del MRR.



**Figura 9. Niveles de transcritos de los genes *AOX1a*, *AOX2*, *ANAC013*, *ANAC017*, *TIM23-2*, *UGT74E2* y *CDKE1*, en líneas WT y *cytc-1b2b*.** El análisis se realizó a partir de ARN total de semillas secas y embebidas durante 6 y 24 h. Para el análisis de RT-qPCR se utilizó *ACTINA* como gen normalizador. Las barras representan la media (+/-EE) de tres réplicas biológicas. (\*) Asteriscos indican diferencias significativas respecto a la línea WT sin imbibición, según la prueba t de Student ( $p < 0,05$ ,  $n=3$ ). EE: error estándar.

Este análisis continuó de forma más exhaustiva y detallada, en el trabajo de tesis doctoral realizado en el laboratorio por la Dra. Sofía Racca, el que también ha sido publicado (Racca et al., 2022). Así, en el laboratorio pudimos determinar que una alteración de los niveles de CYTc impacta directamente en la velocidad de germinación y afecta la respiración mitocondrial y la producción de ATP. En este trabajo demostramos que la mutación en el gen *CYTc-2* estaría asociada a un incremento de la sensibilidad al ABA y a cambios en la homeostasis de esta hormona. Por otra parte, se observó que el ABA reprime la expresión del gen *CYTc-2* e inhibe la respiración mitocondrial en semillas. Esta supresión de la actividad respiratoria podría ser uno de los mecanismos de control de la germinación mediados por ABA.

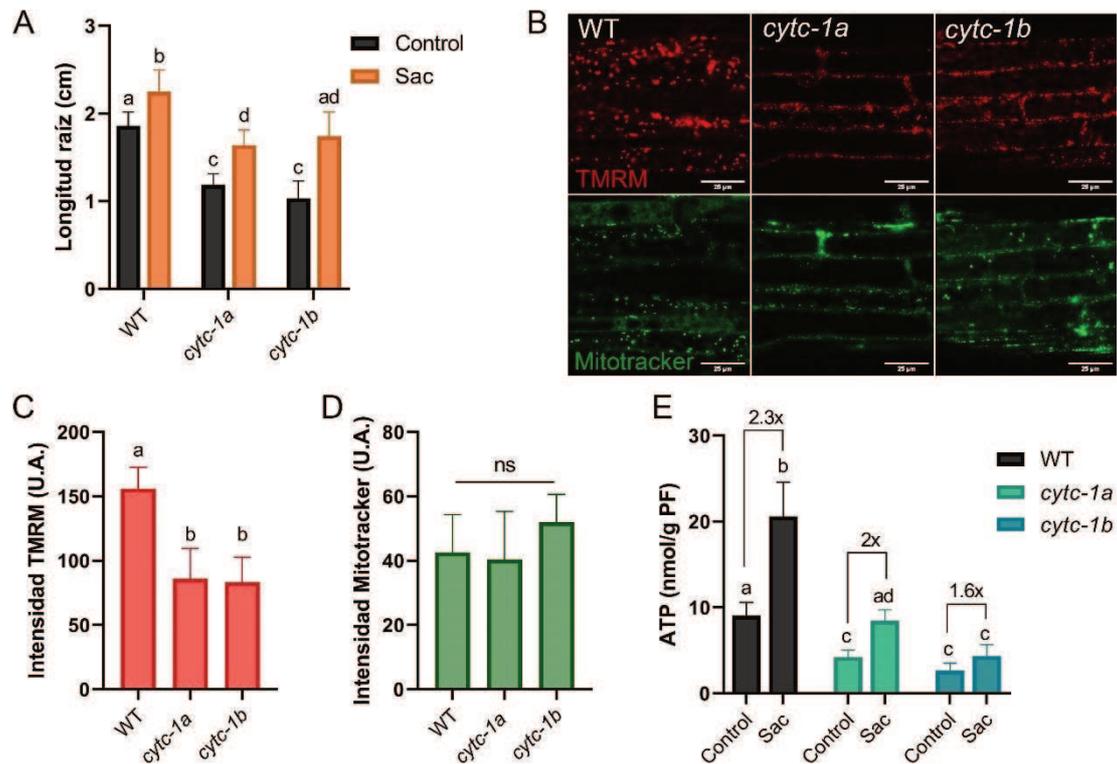
### 6.1.2 Caracterización del crecimiento de la raíz e identificación de parámetros mitocondriales y metabólicos

Dado el rol preponderante que muestra CYTc en la regulación de la germinación, del crecimiento y desarrollo, nos propusimos estudiar en mayor profundidad las mutantes simples en el gen *CYTc-1* (*cytc-1a* y *cytc-1b*), obtenidas previamente en el laboratorio (Welchen et al., 2012).

Analizamos la longitud de la raíz principal, en plántulas de 6 días de edad, crecidas en condición control en medio MS y en presencia de sacarosa 1%. Podemos observar en la **Figura 10A**, que las mutantes *cytc-1a* y *cytc-1b*, poseen raíces más cortas tanto en ausencia como en presencia de sacarosa, respecto a las plantas WT. Por otra parte, se observa que las mutantes *cytc-1* responden de manera significativa al agregado exógeno de sacarosa, pero no son capaces de alcanzar la longitud de raíz de una planta WT.

Según trabajos previos del laboratorio (Welchen et al., 2012), se observó que cultivos de células así como mitocondrias aisladas de plantas mutantes *cytc-1b2a*, presentan una menor actividad respiratoria y una disminución de la estabilidad y actividad del complejo IV. Entendiendo que esta disminución de la actividad en dicho complejo, puede afectar la generación del gradiente electroquímico y por ende la producción de ATP, nos interesó evaluar cómo se encontraba el potencial de membrana mitocondrial en raíces de plantas mutantes simple *cytc-1a* y *cytc-1b*. Para esto utilizamos el colorante fluorescente tetrametilrodamina metil ester (TMRM) (*ThermoFisher*), que tiñe mitocondrias intactas. Como podemos ver en el panel superior de la **Figura 10B**, las mutantes presentan una menor tinción del colorante TMRM, lo que implica un daño mitocondrial que afecta el potencial de membrana. En el panel inferior de esta figura podemos ver las imágenes correspondientes a tinciones con el colorante fluorescente *Mitotracker Green* (*ThermoFisher*), donde no se observaron diferencias significativas entre las mutantes y las plantas WT. Este colorante fue utilizado como control, ya que tiñe las mitocondrias de forma independiente del potencial de membrana. En los paneles **C** y **D** de la **Figura 10**, se muestran las cuantificaciones de la intensidad de fluorescencia correspondientes a los colorantes TMRM y *Mitotracker*, respectivamente.

Luego evaluamos el contenido de ATP en plántulas WT y mutantes en *CYTc-1*, crecidas en medio MS líquido, antes y después del agregado de sacarosa durante 3 h. Podemos ver en la **Figura 10E**, que las plantas mutantes *cytc-1a* y *cytc-1b*, tienen menor contenido de ATP tanto en ausencia como en presencia de sacarosa. Por otra parte, observamos que en las plantas mutantes en *CYTc-1*, el incremento en el contenido de ATP frente al agregado de sacarosa, es menor con respecto a la respuesta evidenciada en plantas WT.

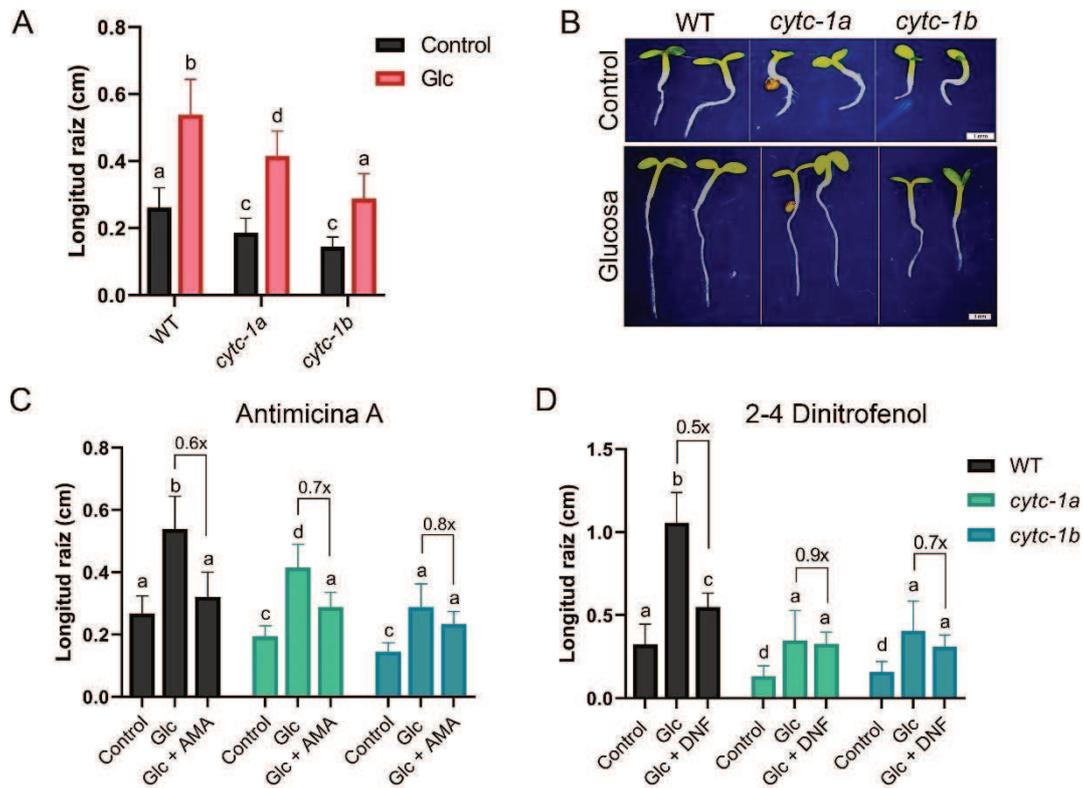


**Figura 10. Análisis fenotípico y de parámetros mitocondriales en mutantes *cytc-1*.** (A)

Longitud de la raíz medida en plantas de 6 días de edad de líneas WT, *cytc1-a* y *cytc1-b*. Fueron cultivadas en placas verticales con medio MS suplementado con 1% de agar, sin la adición de una fuente de carbono (barras negras: control), o con 1% (p/v) de sacarosa (barras naranjas: Sac), en un fotoperiodo de día largo (LD). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de comparación múltiple de Sidak ( $n > 15$ ,  $p < 0,05$ ). (B) Imágenes representativas adquiridas mediante microscopía confocal, de células de raíz de plántulas WT y mutantes (*cytc-1a* y *cytc-1b*), cultivadas por 5 días en placas verticales con medio medio MS, agar al 1% (p/v) y teñidas con 1 mM TMRM 1  $\mu$ M (panel superior) o *Mitotracker Green* 1  $\mu$ M (panel inferior). Barras de escala: 25  $\mu$ m. (C, D) Cuantificación de la intensidad de la fluorescencia mitocondrial de las imágenes obtenidas para TMRM (C) y *Mitotracker Green* (D). Las barras representan la media (+/- DE) de la intensidad de fluorescencia, analizada con el software Fiji. Letras diferentes indican diferencias significativas según las pruebas de Tukey ( $n > 10$  raíces,  $p < 0,05$ ), ns: no significativo. U.A: unidades arbitrarias. (E) Cuantificación del contenido de ATP medido por HPLC, en plántulas de 4 días. Fueron cultivadas durante 3,5 días en medio MS líquido, seguido de una noche prolongada para lograr un estado quiescente (16 h de oscuridad) y luego expuestas a sacarosa 90 mM en oscuridad durante 3 h (Sac). La condición control corresponde a plántulas mantenidas en las mismas condiciones sin adición de azúcar. Letras diferentes indican diferencias significativas basadas en la prueba de Sidak ( $n = 3$  réplicas biológicas,  $p < 0,05$ ). DE: desviación estándar.

Posteriormente, analizamos el efecto de la glucosa en el crecimiento de la raíz en plántulas de 4 días de edad, crecidas en medio MS líquido como se indica en el pie de figura. Al igual que lo observado con sacarosa, vemos en la **Figura 11A**, que las mutantes en *CYTc-1*, tienen raíces más cortas tanto en presencia como en ausencia de glucosa, respecto a las plantas WT. A su vez observamos que las mutantes *cytc-1a* y *cytc-1b* son capaces de elongar la raíz en respuesta a glucosa, pero no pueden igualar la longitud de la raíz WT. En la **Figura 11B** se muestra una imagen representativa de las plántulas WT y mutantes *cytc-1a* y *cytc-1b*, en ambas condiciones de crecimiento. Seguidamente, nos propusimos evaluar el efecto en la longitud de la raíz de dos compuestos inhibidores de la mitocondria, en las condiciones de crecimiento previamente mencionadas. Utilizamos el inhibidor antimicina A (AMA), que actúa sobre el complejo III, y el 2-4 dinitrofenol, un agente desacoplante (DNF). En la **Figura 11C y D**, podemos ver las cuantificaciones obtenidas, donde se observa en primer lugar para las plantas WT, que ambos compuestos generan una inhibición del efecto de la glucosa, en el crecimiento de la raíz. Por otro lado, vemos que las mutantes *cytc-1a* y *cytc-1b* presentan una sensibilidad menor a estos compuestos, respecto a las plantas WT. Si comparamos los valores obtenidos para la condición de glucosa y glucosa más el inhibidor (señaladas con corchetes en ambas gráficas), vemos que la inhibición del crecimiento en las plantas WT es significativa y representa un 40% para antimicina A (AMA), y un 50% para el 2-4 dinitrofenol (DNF). Realizando el mismo análisis para las mutantes *cytc-1a* y *cytc-1b*, tomando los valores promedios obtenidos, vemos que la inhibición se encuentra entre un 10% y un 30%, y en la mayoría de los casos no es significativa, contrariamente a lo observado para el genotipo WT, evidenciando una sensibilidad reducida de las mutantes *CYTc-1* a los inhibidores mitocondriales.

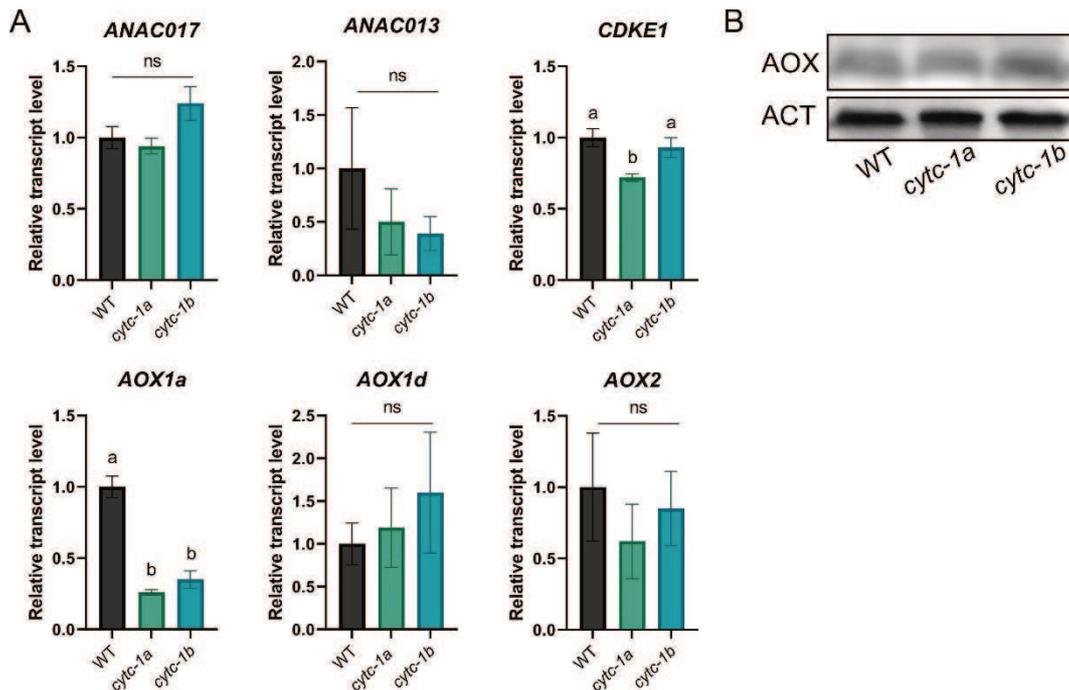
Teniendo en cuenta los resultados de potencial de membrana mitocondrial y contenido de ATP expuestos previamente, postulamos que la menor sensibilidad de las mutantes en *CYTc-1* a estos tratamientos para inhibir o alterar el transporte de electrones se debe a que estas plantas en condiciones basales presentan defectos mitocondriales y energéticos, que a su vez limitan su crecimiento.



**Figura 11. Evaluación de la respuesta a glucosa y efecto de inhibidores mitocondriales en el crecimiento de la raíz de mutantes *cytc-1a* y *cytc-1b*.** (A) Respuesta del crecimiento de las raíces a la glucosa. Se utilizaron plantas WT y mutantes *cytc-1*, que fueron cultivadas durante 3,5 días en medio MS líquido y luego 16 h de oscuridad. Se agregó glucosa a una concentración final de 20 mM por 24 h en luz, y se midió la longitud de la raíz. Las barras representan la media (+/- DE) de la longitud de la raíz para plantas cultivadas sin adición de glucosa (barras negras: Control) o en presencia de glucosa (barras rosadas: Glc). Letras diferentes indican diferencias significativas basadas en la prueba de Sidak ( $n > 15$ ,  $p < 0,05$ ). (B) Imágenes representativas de plantas WT y mutantes *cytc-1* (*cytc-1a* y *cytc-1b*), correspondientes al ensayo detallado en (A). Barra de escala: 1 mm. (C, D) Longitud de la raíz (cm) medida en presencia del inhibidor de la cadena de transporte de electrones mitocondrial Antimicina A (AMA, 1  $\mu$ M) durante 24 h (C) o el desacoplante 2,4-dinitrofenol (DNF, 50  $\mu$ M) durante 48 h (D). Se cultivaron plantas WT, mutantes *cytc-1a* y *cytc-1b* como se indicó en (A) y se trataron con glucosa en presencia o ausencia de los inhibidores. Los resultados se compararon mediante la prueba de Sidak ( $n > 15$ ,  $p < 0,05$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas.

Dado que un bloqueo en la vía respiratoria dependiente de CYTc puede causar la activación de la respuesta retrógrada mitocondrial (MRR) (Ng et al., 2014), evaluamos la expresión de la oxidasa alternativa (AOX) y otros componentes de la vía de señalización MRR en las condiciones de crecimiento analizadas. No observamos diferencias significativas en los niveles de expresión, excepto por una disminución en

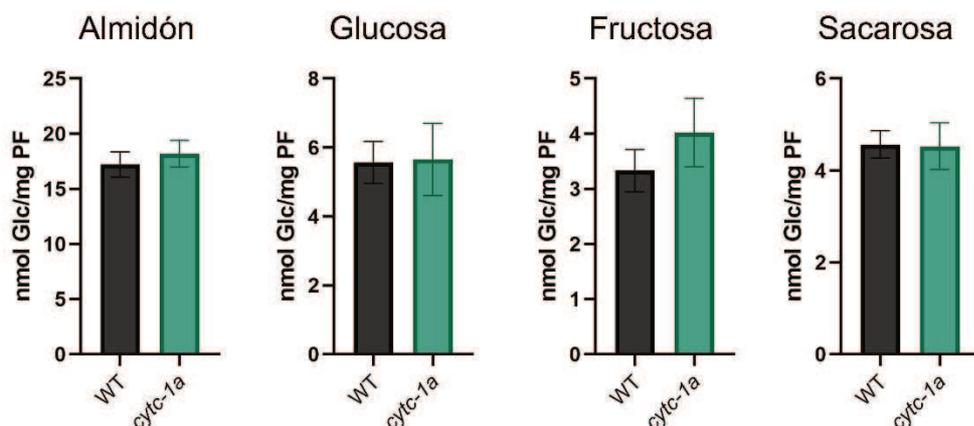
AOX1a, que no se tradujo en niveles más bajos de proteína AOX en plantas con deficiencia de CYTc en comparación con las plantas WT (**Figura 12A, B**). Estos resultados sugieren que el defecto en el crecimiento de las raíces de plantas mutantes *cytc-1*, probablemente sea causado por una función mitocondrial cambios metabólicos o energéticos alterados, que no están relacionados con la activación de la MRR.



**Figura 12.** Respuesta retrógrada mitocondrial en mutantes *cytc-1*. **(A)** Niveles de transcripto de genes de respuesta retrógrada mitocondrial en plantas WT, *cytc-1a* y *cytc-1b*. Las plántulas se cultivaron durante 6 días en placas de Petri con medio MS agar al 0,8% (p/v) en fotoperiodo LD. Se extrajo ARN total y se analizó mediante RT-qPCR. Se utilizó *ACTINA* como gen normalizador. Las barras representan la media (+/- DE) de 3 réplicas biológicas. Letras diferentes indican diferencias significativas basadas en la prueba de Tukey (3 réplicas biológicas,  $p < 0,05$ ). ns: no significativo. **(B)** Análisis de *Western Blot* realizado en extractos de proteínas totales utilizando un anticuerpo anti-AOX1/2 en plantas WT, *cytc-1a* y *cytc-1b*. Las plántulas se cultivaron como se indica en (A). Se utilizó un anticuerpo anti-actina como control de carga.

Para determinar si los defectos mitocondriales presentes en las mutantes *CYTc-1*, tenían un impacto a nivel metabólico, determinamos en la mutante *cytc-1a*, el contenido de almidón y de los azúcares solubles glucosa, fructosa y sacarosa. Las plantas fueron crecidas durante 5 días, en medio MS agar, tanto en presencia como en ausencia de sacarosa 1%. En la **Figura 13** se muestran únicamente los resultados obtenidos en

presencia de sacarosa ya que fueron los mismos en ambas condiciones, donde no observamos diferencias significativas para ninguno de los metabolitos evaluados, entre las plántulas WT y *cytc-1a*. Esto demuestra que los defectos en el crecimiento que evidencian las mutantes en *CYTC-1*, se deben principalmente a defectos mitocondriales y energéticos, y no a defectos en el metabolismo de los carbohidratos. En este sentido, esta idea se refuerza con el resultado previo donde el agregado de fuentes de carbono exógenas (sacarosa y glucosa), no es suficiente para revertir el fenotipo de raíces cortas de las mutantes *cytc-1a* y *cytc-1b*.

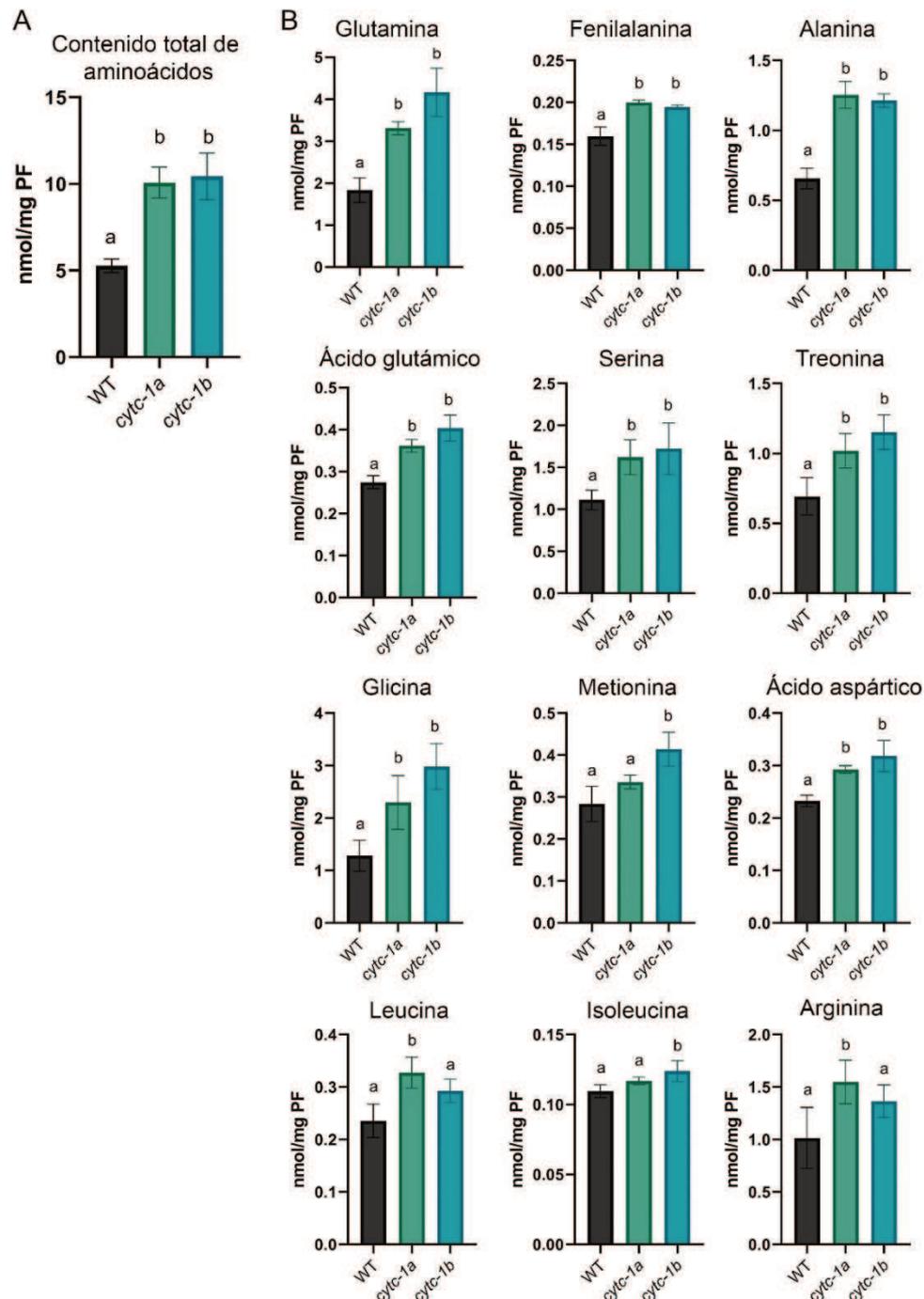


**Figura 13. Contenido de almidón y azúcares solubles en plántulas WT y mutantes *cytc-1a*.**

Cuantificación del contenido de almidón, glucosa, fructosa y sacarosa (nmol Glic/mg PF) en plantas WT y mutantes *cytc-1a* cultivadas durante 5 días en placas verticales de medio MS que contiene agar al 1% (p/v) y 1% (p/v) de sacarosa, en fotoperiodo LD. Las determinaciones se realizaron mediante un método enzimático, según Stitt et al. (1989). Las barras representan la media (+/- DE) de 5 réplicas biológicas. PF: peso fresco.

Para conocer en mayor profundidad el estado metabólico de las mutantes en *CYTC-1*, realizamos una cuantificación del contenido de aminoácidos en estas plantas. En la **Figura 14A** se presentan los resultados obtenidos, donde vemos que las mutantes *cytc-1a* y *cytc-1b*, poseen una cantidad significativamente mayor en el contenido de aminoácidos totales, respecto a las plantas WT. Seguidamente, para conocer en detalle qué aminoácidos se encontraban aumentados, cuantificamos mediante HPLC el contenido individual de los mismos, en plántulas de 5 días de edad crecidas en sacarosa 1%. Como podemos ver en la **Figura 14B**, pudimos determinar el nivel de 12 aminoácidos, los cuáles se encontraron aumentados en ambas mutantes en la mayoría

de los casos, y sino en al menos una de ellas, indicando que las mutantes en *CYTc-1* presentan un aumento generalizado de aminoácidos. De esta manera podemos decir que los defectos en el crecimiento de las mutantes, no se deben a una alteración en el metabolismo de los carbohidratos, sino que podría deberse a una desregulación en el metabolismo de los aminoácidos.



**Figura 14. Contenido total y perfil individual de aminoácidos determinado por HPLC en plántulas WT y mutantes *cytc-1a* y *cytc-1b*.** (A) Contenido total de aminoácidos libres (nmol/mg PF) determinado en plántulas WT, *cytc-1a* y *cytc-1b*. Fueron cultivadas durante 5 días en placas verticales con medio MS que contenía 1% (p/v) de agar y 1% (p/v) de sacarosa, en condiciones de LD. Letras diferentes indican diferencias significativas basadas en la prueba de Tukey (3 réplicas biológicas,  $p < 0,05$ ). (B) Perfil de aminoácidos individuales determinado por HPLC en los extractos de plantas evaluados en (A). Las barras representan la media (+/- DE). Letras diferentes indican diferencias significativas basadas en la prueba de Tukey (3 réplicas biológicas,  $p < 0,05$ ).

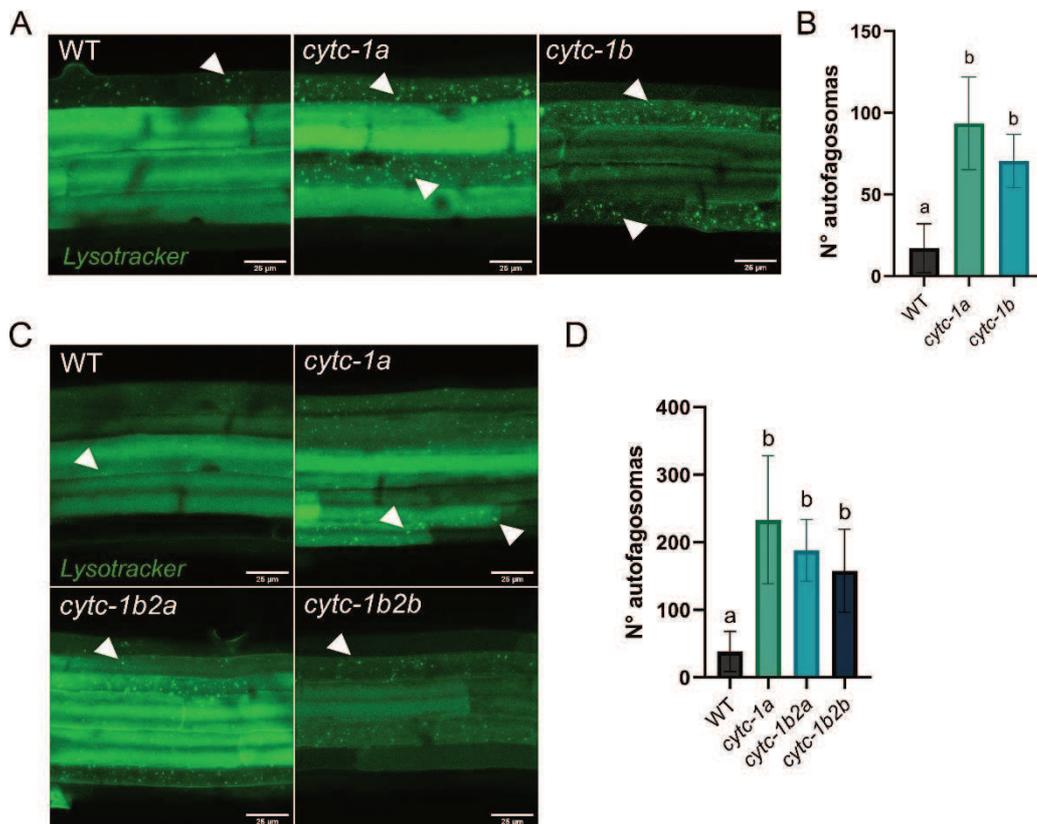
## 6.2 Interacción entre la función mitocondrial y el proceso de autofagia

### 6.2.1 Evaluación del proceso de autofagia en mutantes *cytc-1*

Sabemos que el contenido de amino ácidos libres aumenta en condiciones de hambre o “*starvation*”, sirviendo como fuente de carbono y energía alternativa. Por otro lado, en esta condición metabólica se activa el proceso de autofagia que le permite a la célula degradar y reciclar nutrientes para obtener energía y sobrellevar la condición de estrés. Es por esto, que nos propusimos evaluar cómo se encontraba dicho proceso en las plantas mutantes *cytc-1a*. Para esto utilizamos distintos enfoques; el primero de ellos consistió en utilizar un colorante fluorescente denominado *Lysotracker* (*ThermoFisher*), que tiñe vacuolas ácidas, y es ampliamente utilizado en distintos organismos para la detección de autofagosomas; y por otro lado, utilizamos la línea reportera de *A. thaliana* 35S::GFP-ATG8 (Huang et al., 2019). Esta línea marca específicamente los autofagosomas, ya que la proteína ATG8 se encuentra rodeando la membrana de los mismos. Debido a la fusión de ATG8 con la proteína GFP, es posible medir el proceso de autofagia mediante microscopía de fluorescencia, así como también es posible determinar la dinámica de la autofagia mediante inmunodetección, realizando un *Western Blot* contra la proteína GFP. La degradación vacuolar del contenido almacenado en los autofagosomas libera proteína GFP, proveniente de la escisión con la proteína ATG8, por lo que realizando el cociente GFP/GFP-ATG8 se puede estimar el nivel de autofagia.

En la **Figura 15A**, podemos ver las imágenes obtenidas de la tinción de raíces con el colorante *Lysotracker*, en plantas WT, *cytc-1a* y *cytc-1b*. Las puntas de flecha de color blanco indican la presencia de puntos correspondientes a los autofagosomas que se acumulan como estructuras fluorescentes en compartimentos ácidos. Tal como se muestra en la cuantificación de la **Figura 15B**, vemos que ambas mutantes *cytc-1a* y *cytc-1b* presentan un mayor número de autofagosomas respecto a las plantas WT, lo que indica un mayor nivel de autofagia.

Por otro lado, al evaluar las mutantes dobles *cytc-1b2a* y *cytc-1b2b* (**Figura 15C, D**) vemos el mismo comportamiento; presentan un mayor nivel de autofagia respecto a las plantas WT, comparable con el de las mutantes simples en *CYTc-1*.

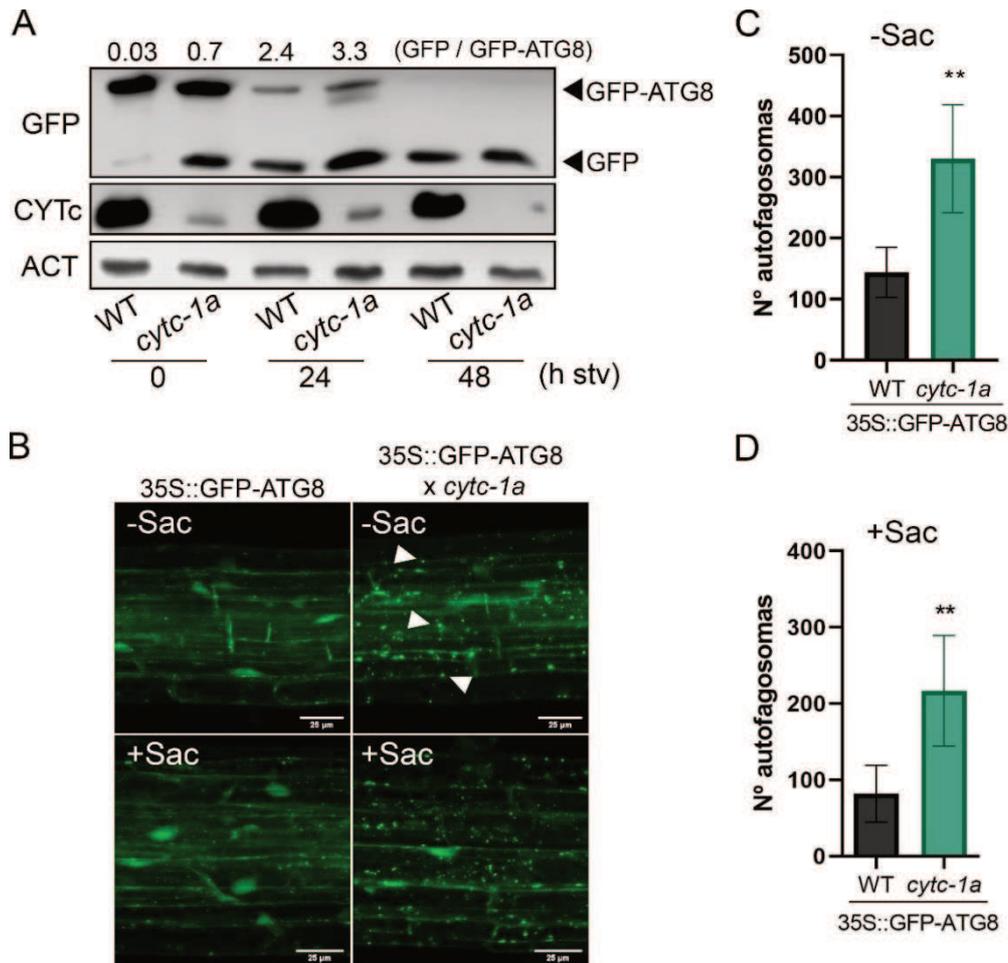


**Figura 15. Determinación del nivel de autofagia en plantas deficientes en CYTc. (A, C)** Imágenes representativas adquiridas por microscopía confocal de raíces de 5 días de edad de plantas WT, mutantes simples (*cytc-1a*; *cytc-1b*) (A) y mutantes dobles (*cytc-1b2a*; *cytc-1b2b*) (C), teñidas con *Lysotracker Green* 1  $\mu$ M. Las plantas se cultivaron en placas verticales en medio MS, agar al 1% (p/v) y sacarosa 1% (p/v), en fotoperiodo de LD. Las flechas indican estructuras correspondientes a los autofagosomas. Barras de escala: 25  $\mu$ m (B, D) Cuantificación del número de puntos por raíz (equivalentes a los autofagosomas presentes) correspondientes a los experimentos mostrados en (A) y (C). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $n > 10$  raíces,  $p < 0,05$ ).

Posteriormente, realizamos un ensayo de *Western Blot* para observar la dinámica del proceso de autofagia (Figura 16A), con plántulas de 5 días de edad, crecidas en presencia de sacarosa y luego sometidas a 24 y 48 h de oscuridad en ausencia de sacarosa. Esto se realizó con la línea reportera 35S::GFP-ATG8 tanto en el fondo genético o “background” (del inglés, comúnmente utilizado) WT como mutante *cytc-1a*. Al realizar la inmunodetección con anti-GFP se puede observar una banda inferior (27 kDa) que corresponde a la cantidad de proteína GFP libre, y la banda superior (45 kDa) correspondiente a la proteína de fusión GFP-ATG8. Calculamos el cociente GFP/GFP-ATG8 y obtuvimos que éste es significativamente mayor en la mutante *cytc-1a* respecto

a la planta WT, en condiciones óptimas de crecimiento. Al someter las plantas a privación de nutrientes, vemos que en ambos genotipos aumenta la cantidad de GFP libre respecto a su condición inicial, demostrando un aumento de la autofagia en respuesta a oscuridad. Cabe destacar también, que las diferencias iniciales entre la planta WT y mutante *cytc-1a* comienzan a disminuir conforme avanza el tiempo de hambreado o “*starvation*”, lo cual tiene sentido ya que las mutantes *cytc-1a* tienen el proceso de autofagia activo de forma basal.

Seguidamente evaluamos por microscopía confocal la presencia de autofagosomas, en raíces de plántulas de 5 días, crecidas tanto en ausencia (**Figura 16B, panel superior**) como en presencia de sacarosa (**Figura 16B, panel inferior**), utilizando las líneas 35S::GFP-ATG8 y 35S::GFP-ATG8 x *cytc-1a*. Se muestran imágenes representativas de cada línea en ambas condiciones de crecimiento, y se señalan con puntas de flecha los autofagosomas. Como se muestra en las cuantificaciones de la **Figura 16C y D**, vemos que la mutante *cytc-1a* tiene mayor número de autofagosomas respecto a las plantas WT, en ambas condiciones de crecimiento. Tomando en conjunto los diferentes enfoques y técnicas utilizadas para evaluar el proceso de autofagia, podemos decir que la falta de *CYTc-1* genera un aumento en el proceso de autofagia, incluso cuando las plantas se encuentran en condiciones nutricionales óptimas.



**Figura 16. Análisis del proceso de autofagia en línea 35S::GFP-ATG8 y la línea de cruce 35S::GFP-ATG8 x *cytc-1a*.** (A) Análisis de *Western Blot* que muestra la dinámica de la autofagia mediante la cuantificación de la relación GFP/GFP-ATG8, utilizando un anticuerpo anti-GFP (Agrisera #AS152987) en extractos de proteínas totales, elaborados a partir de plantas WT y mutantes *cytc-1a* (en el fondo genético 35S::GFP-ATG8). Las plantas fueron cultivadas durante 5 días en placas verticales con medio MS que contenía 1% (p/v) de agar y 1% (p/v) de sacarosa, y luego se expusieron a oscuridad sin sacarosa durante 24 y 48 h (h stv), en condiciones de LD. Se utilizó anticuerpo anti-actina (Agrisera #AS132640) como control de carga en la misma membrana y anticuerpo anti-CYTc (Agrisera #AS08343A) para corroborar la identidad de las líneas utilizadas. Los números encima de la imagen corresponden a la relación GFP/GFP-ATG8 para cada línea. (B) Imágenes representativas adquiridas mediante microscopía confocal, de raíces de 5 días de edad de plantas WT y *cytc-1a*, en *background* 35S::GFP-ATG8. Las plantas se cultivaron durante 5 días en placas verticales con medio MS, agar 1% (p/v), en ausencia de sacarosa (-Sac, panel superior) o en presencia de sacarosa al 1% (p/v) (+Sac, panel inferior), en un ciclo diurno LD. Barras de escala: 25  $\mu$ m (C, D) Cuantificación del número de autophagosomas del experimento mostrado en (B), en ausencia de sacarosa (C) y en presencia de sacarosa (D). (\*\*) Los asteriscos representan diferencias significativas basadas en la prueba t de Student ( $p < 0,005$ ,  $n > 10$  raíces).

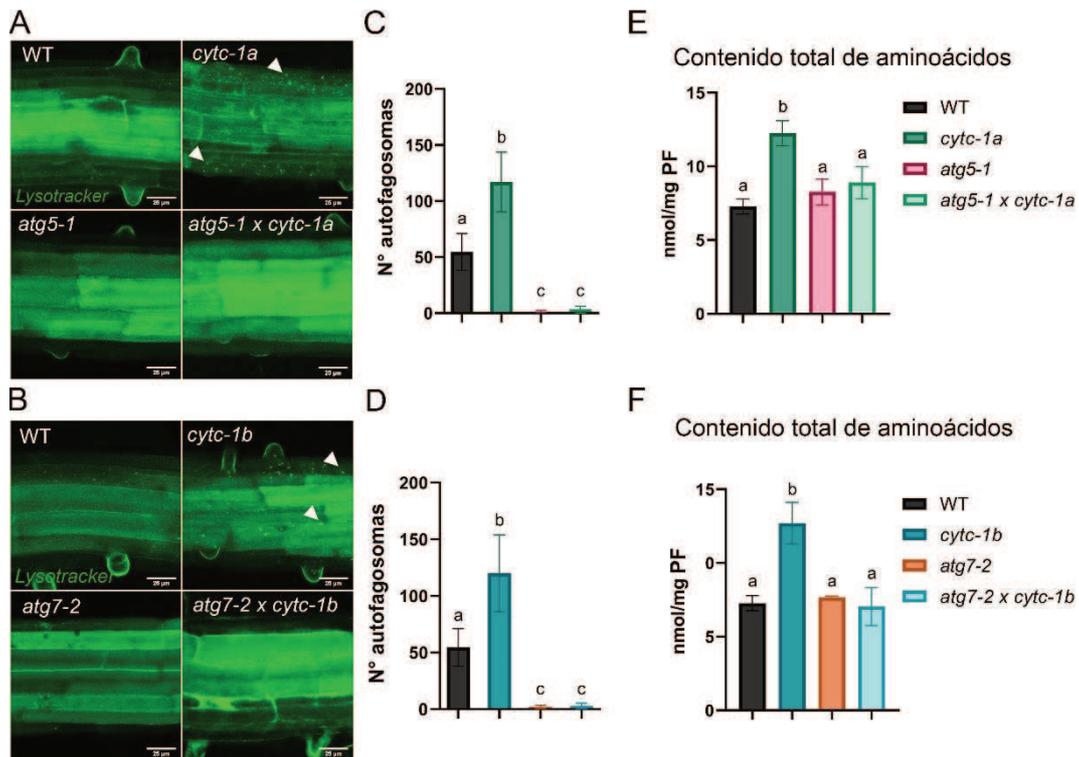
## 6.2.2 Obtención y caracterización de líneas de cruzas *atg5-1 x cytc-1a* y *atg7-2 x cytc-1b*

### 6.2.2.1 Determinación del nivel de autofagia y contenido de aminoácidos

Dado los resultados previamente mencionados, nos propusimos entender cuál era el rol de la autofagia en las plantas mutantes en *CYTC-1*. Para esto, bloqueamos de forma genética el proceso de autofagia en las mutantes *cytc-1a* y *cytc-1b*, mediante la obtención de cruzas con plantas mutantes en los genes *ATG5* y *ATG7* (Goto-Yamada et al., 2019; Kacprzak & Van Aken, 2022; Thompson et al., 2005).

Una vez obtenidas las líneas doble homocigotas, tanto para las mutaciones en *CYTC-1* como en los genes *ATG*, comenzamos evaluando el proceso de autofagia mediante tinción con *Lysotracker*, utilizando raíces de plántulas de 5 días, crecidas en sacarosa 1%. En la **Figura 17A y B**, podemos ver las imágenes representativas de microscopía confocal, correspondientes a las líneas de cruzas *atg5-1 x cytc-1a* (**A**) y *atg7-2 x cytc-1b* (**B**), junto a los respectivos controles WT y mutantes. En los paneles **C** y **D** vemos los resultados de las cuantificaciones del número de autofagosomas para cada genotipo. Tal como observamos previamente, vemos que las mutantes *cytc-1a* y *cytc-1b* poseen aumentado el proceso de autofagia, así como también confirmamos que las mutantes *atg5-1* y *atg7-2* tienen bloqueado el proceso de autofagia, ya que presentan un número muy bajo de autofagosomas. Al evaluar el nivel de autofagia en las líneas de cruzas, vemos que también se encuentra bloqueado, dado que el número de autofagosomas es muy bajo, comparable con el valor que presentan las mutantes *atg5-1* y *atg7-2*.

Con el objetivo de determinar si el aumento generalizado de aminoácidos en las mutantes en *CYTC-1* provenían del proceso de autofagia, cuantificamos en las líneas *atg5-1 x cytc-1a* y *atg7-2 x cytc-1b* el contenido de aminoácidos totales. Se observan en la **Figura 17E y F** las cuantificaciones correspondientes, donde se puede ver nuevamente que las mutantes *cytc-1a* y *cytc-1b* tienen mayor contenido de aminoácidos, y que las mutantes *atg5-1* y *atg7-2* no presentan diferencias significativas, respecto a las plantas WT. Por último, vemos que las líneas de cruce presentaron niveles comparables con el de las plantas mutantes en los genes *ATG*. Ambos resultados mostrados en esta figura nos indican que bloquear el proceso de autofagia en las mutantes en *CYTC-1* genera una normalización en los niveles de aminoácidos, por lo que podríamos proponer que el incremento en el contenido de los mismos se debe al proceso de autofagia inducido que presentan las plantas mutantes en *CYTC-1*.



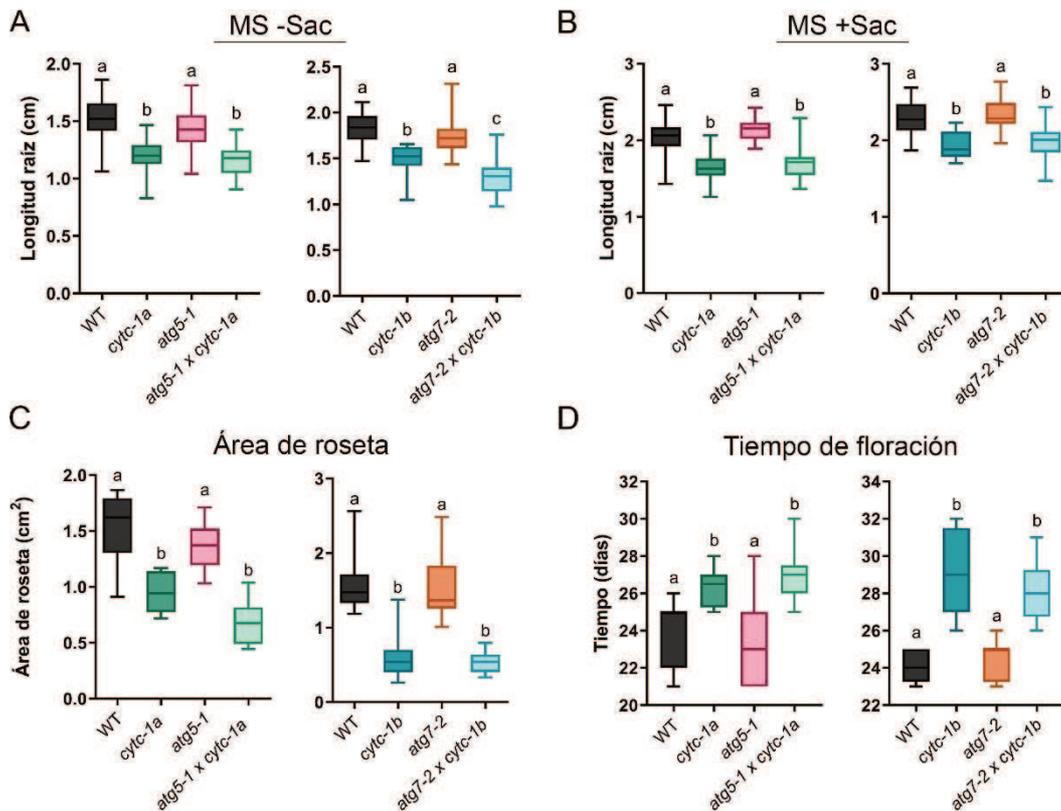
**Figura 17. Análisis del proceso de autofagia y del contenido total de aminoácidos en mutantes en *CYTC-1* con el proceso de autofagia inhibido. (A, B)** Imágenes representativas, adquiridas mediante microscopía confocal, de raíces de 5 días de edad, cultivadas en placas verticales con medio MS suplementado con agar 1% (p/v) y sacarosa 1% (p/v), en condiciones de LD. Las raíces fueron teñidas con *LysoTracker Green* 1  $\mu$ M (*ThermoFisher*). Los genotipos analizados fueron WT, mutantes *cytc-1* (*cytc-1a* y *cytc-1b*), mutantes *atg5-1* y *atg7-2*, y las respectivas líneas dobles mutantes (*atg5-1 x cytc-1a* y *atg7-2 x cytc-1b*). Barras de escala: 25  $\mu$ m. **(C, D)** Cuantificación del número de autofagosomas correspondientes al experimento mostrado en (A, B). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $n > 8$  raíces,  $p < 0,05$ ). **(E, F)** Contenido total de aminoácidos libres (nmol/mg PF) determinado en los genotipos mencionados en (A, B). Letras diferentes indican diferencias significativas basadas en la prueba de Tukey (4 réplicas biológicas,  $p < 0,05$ ).

### 6.2.2.2 Análisis fenotípico

Para conocer el impacto de inhibir la autofagia en las mutantes en *CYTC-1*, analizamos fenotípicamente las cruza *atg5-1 x cytc-1a* y *atg7-2 x cytc-1b*. Determinamos la longitud de la raíz en plántulas de 6 días de edad, en ausencia (**Figura 18A**) y en presencia de sacarosa (**Figura 18B**). Los resultados obtenidos muestran que las mutantes *cytc-1a* y *cytc-1b* tienen raíces más cortas que las plantas WT, en concordancia con los resultados obtenidos previamente, y que las mutantes *atg5-1* y *atg7-2* no presentan diferencias significativas con el genotipo WT. Al analizar las cruza vemos que presentan el mismo

fenotipo de raíces cortas que ambas mutantes *CYTc-1*. Esto revela que bloquear la autofagia no tiene un impacto a nivel fenotípico de raíz, ni en plantas WT ni en las mutantes en *CYTc-1*.

Por otro lado, analizamos el fenotipo en estadio vegetativo adulto, y determinamos parámetros como área de roseta y tiempo de floración (**Figura 18C, D**). En la **Figura 18C** podemos ver que tanto las mutantes en *CYTc-1* como las dobles mutantes *atg5-1 x cytc-1a* y *atg7-2 x cytc-1b*, tienen un área de roseta menor que las plantas WT. Por otro lado, las mutantes *atg5-1* y *atg7-2* no presentan diferencias significativas con las plantas WT. Para el tiempo de floración (**Figura 18D**) vemos que las mutantes *cytc-1a* y *cytc-1b* junto con las cruces *atg5-1 x cytc-1a* y *atg7-2 x cytc-1b*, florecen entre 3 y 5 días más tarde respecto a las plantas WT, y por otro lado que las mutantes *atg5-1* y *atg7-2* florecen al mismo momento que una planta WT. Es decir que, en estadio de desarrollo adulto, bloquear la autofagia no genera ningún impacto fenotípico en las mutantes *CYTc-1*. Estos resultados indican que la autofagia no sería la responsable de los defectos en el crecimiento de las mutantes en *CYTc-1*, así como tampoco estaría funcionando como fuente de energía.



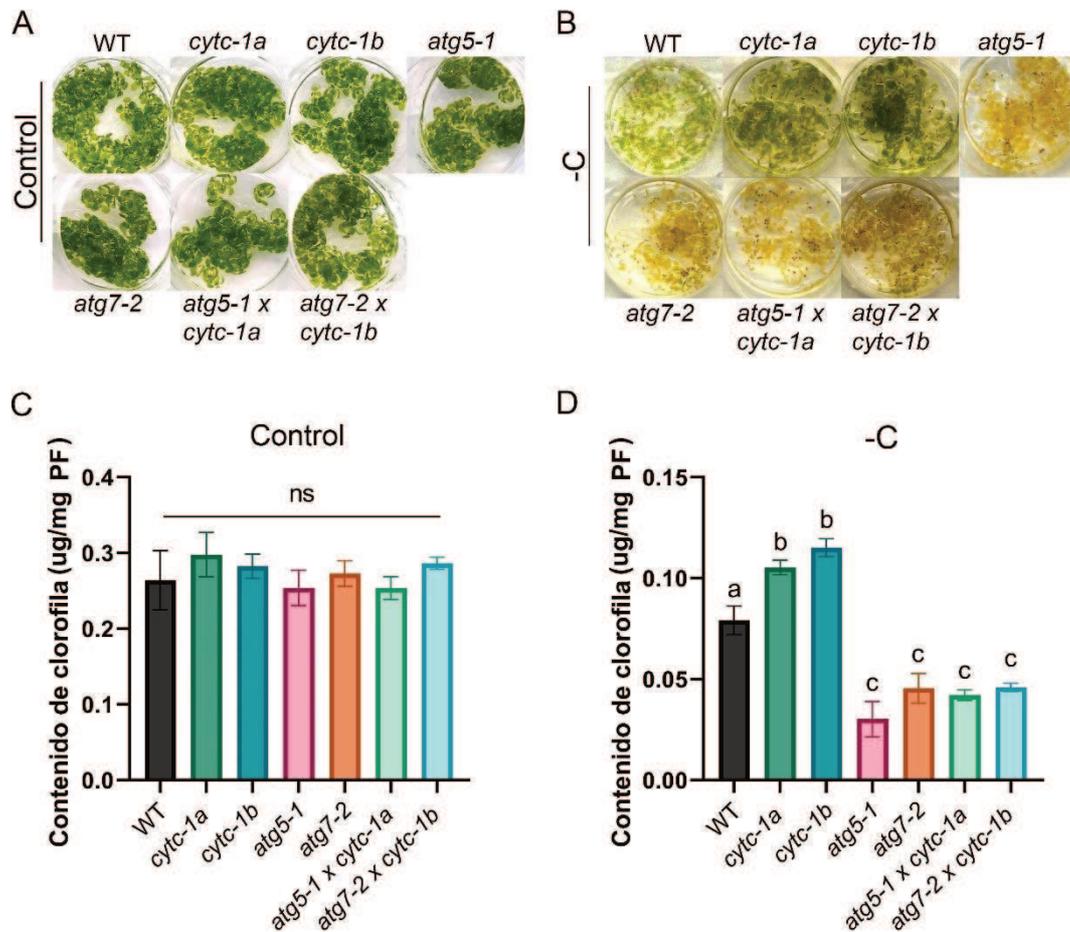
**Figura 18. Cuantificación de la longitud de raíz en plántula y parámetros fenotípicos en estadios adultos, en líneas *atg5-1 x cytc-1a* y *atg7-2 x cytc-1b*.** (A, B) Longitud de la raíz (cm) medida en plántulas de 6 días cultivadas en placas verticales con medio MS agar 1% (p/v), ya sea en ausencia (A) o presencia (B) de sacarosa 1% (p/v) (Sac), en condiciones de LD. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $n > 10$ ,  $p < 0,05$ ). (C, D) Cuantificación del área de roseta (cm<sup>2</sup>) (C) y tiempo de floración (D), de plantas WT, mutantes *cytc-1* (*cytc-1a* y *cytc-1b*), mutantes *atg* (*atg5-1* y *atg7-2*), y las respectivas líneas dobles mutantes (*atg5-1 x cytc-1a* y *atg7-2 x cytc-1b*), cultivadas en tierra durante 17 días en ciclo diurno LD. Las barras indican la media (+/- DE). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $n > 8$ ,  $p < 0,05$ ).

### 6.2.2.3 Análisis del efecto de restricción de carbono

Como sabemos, el proceso de autofagia cobra relevancia cuando las condiciones nutricionales son limitantes, permitiéndole a la célula obtener energía y sobreponerse a esta condición. Para poder revelar la importancia de la autofagia en las mutantes *cytc-1a* y *cytc-1b*, sometimos a los distintos genotipos a una condición de restricción de carbono o “starvation” mediante tratamientos con oscuridad y eliminando la fuente de carbono exógena (sacarosa). Luego determinamos el contenido de clorofila antes y

después del tratamiento, como un parámetro de sensibilidad a este estrés. Se utilizaron plántulas de líneas WT, mutantes en *CYTc-1*, mutantes en *ATG*, y las respectivas líneas de cruza. En la **Figura 19A** se muestran imágenes del fenotipo de las plántulas correspondientes a la condición control y en la **Figura 19B** las plántulas luego de 7 días de tratamiento en oscuridad. En la **Figura 19C** vemos los resultados del contenido de clorofila para la condición de crecimiento óptima, donde vemos que no hay diferencias significativas entre los distintos genotipos. Luego del período de deprivación de carbono, podemos ver que las mutantes *cytc-1a* y *cytc-1b*, poseen un mayor contenido de clorofila que las plantas WT (**Figura 19D**), y que las mutantes *atg5-1* y *atg7-2* presentan un contenido menor. Cuando bloqueamos el proceso de autofagia en las mutantes *cytc-1* (líneas *atg5-1 x cytc-1a* y *atg7-2 x cytc-1b*) vemos que el contenido de clorofila cae significativamente a niveles comparables al de las mutantes en los genes *ATG*.

Estos resultados indican, por un lado, que las plantas deficientes en *CYTc-1* tienen una mayor tolerancia al estrés por restricción de carbono, similar a lo que ocurre en plantas que poseen una señal de hambre o *starvation* activa basalmente (Mair et al., 2015), y que esta tolerancia se pierde al inhibir el proceso de autofagia. Por otro lado, vemos que las mutantes en los genes *ATG* son hipersensibles a la falta de nutrientes, lo que se condice con lo reportado en bibliografía (Goto-Yamada et al., 2019; Thompson et al., 2005). Por otra parte, resultados previos del laboratorio refuerzan esta idea, ya que se observó que plantas con bajos niveles de *CYTc*, exhiben un retraso en el inicio del proceso de senescencia (Welchen et al., 2012). De esta manera podemos decir, que la autofagia cobra relevancia durante situaciones de restricción de carbono y ante la deficiencia de *CYTc-1*, permitiéndoles a las plantas obtener energía mediante el reciclado de nutrientes.



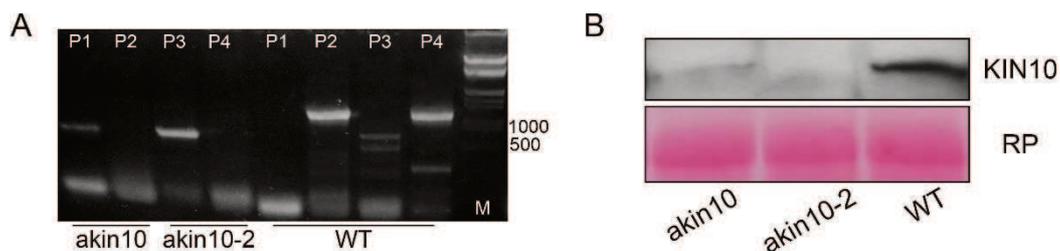
**Figura 19. Cuantificación del contenido de clorofila en condiciones óptimas de crecimiento y en restricción de carbono o hambreado. (A, B)** Imágenes representativas de las plántulas correspondientes al ensayo de deprivación de nutrientes o *starvation*. Las plántulas de los genotipos WT, mutantes *cytc-1* (*cytc-1a* y *cytc-1b*), mutantes *atg5-1* y *atg7-2*, y las respectivas líneas dobles mutantes (*atg5-1 x cytc-1a* y *atg7-2 x cytc-1b*) se cultivaron durante 3,5 días en medio líquido MS seguido de una noche prolongada para el agotamiento de nutrientes (16 h de oscuridad) y luego se trataron con sacarosa 20 mM y luz durante 3 días para inducir el crecimiento. Luego la mitad de las plantas se mantuvieron en sacarosa durante 7 días ("condición control": A), y el resto se mantuvo en oscuridad sin sacarosa durante el mismo tiempo para inducir el *starvation* ("-C": B). **(C, D)** Cuantificación del contenido de clorofila (µg/mg PF) de plantas en las condiciones de crecimiento de talladas previamente ("Control": panel C; "-C": panel D). Las barras representan la media (+/-DE). Letras diferentes indican diferencias significativas basadas en las pruebas de Tukey (5 réplicas biológicas,  $p < 0,05$ ), ns: no significativo.

### 6.3 Interacción entre el CYTc y la vía de SnRK1

En función de los resultados previos sobre las mutantes *CYTc-1*, en los que observamos que presentan defectos en el crecimiento, así como también una alteración en el contenido de aminoácidos y en el proceso de autofagia, nos propusimos analizar qué estaba ocurriendo con la vía de señalización SnRK1. Sabemos que esta vía se activa frente a condiciones de estrés, y regula el crecimiento, coordinando a su vez la respuesta con otras vías centrales como la vía TOR y en función de la disponibilidad energética mitocondrial.

Para este análisis, utilizamos dos líneas de plantas mutantes en la proteína KIN10 (*akin10* y *akin10-2*), que corresponde a la subunidad catalítica de la quinasa SnRK1. Realizamos la genotipificación mediante PCR sobre ADN genómico de plantas mutantes *KIN10* (*akin10*) y plantas WT, para confirmar que contábamos con líneas homocigotas para la mutación.

Como se puede ver en el gel de la **Figura 20A**, ambas mutantes presentan una banda de amplificación del tamaño esperado, que confirma la presencia del T-DNA (P1 y P3). Al analizar el control WT vemos que hay amplificación negativa para P1, y algunas bandas inespecíficas de diferentes tamaños para P3. Por otro lado, al analizar la amplificación del alelo WT (P2 y P4), vemos que hay amplificación positiva en el caso de la planta WT, pero no hay amplificación sobre las muestras de ADN genómico de las mutantes *akin10* y *akin10-2*, demostrando que son plantas homocigotas para la inserción.

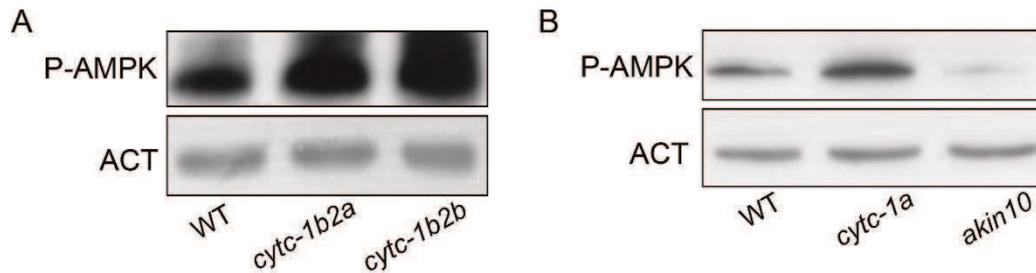


**Figura 20. Caracterización molecular de plantas mutantes *akin10* y *akin10-2*.** (A) PCR sobre ADN genómico WT, *akin10* y *akin10-2*. Se utilizaron diferentes combinaciones de oligonucleótidos para la detección de los alelos mutantes y WT. P1: T-DNA GK-*akin10* RP. P2: *akin10* LP-*akin10* RP. P3: Lbb1.3-*akin10-2* RP. P4, *akin10-2* LP-*akin10-2* RP. M: marcador de peso molecular. Los números indican el tamaño en pares de bases (pb). (B) *Western Blot* realizado a partir de extractos de proteínas totales de plantas WT, *akin10* y *akin10-2*. Se utilizó un anticuerpo específico anti-KIN10 (Agrisera, #AS21 4581) y la tinción con rojo *ponceau* como control de carga.

Decidimos corroborar mediante *Western Blot*, los niveles de proteína KIN10. Para esto realizamos extracción de proteínas totales de plantas mutantes *KIN10* y plantas WT, y mediante un anticuerpo específico anti-KIN10 medimos sus niveles. Como se puede ver en la **Figura 20B**, la línea WT presenta niveles detectables de la subunidad catalítica KIN10, mientras que las líneas mutantes *akin10* y *akin10-2* presentan niveles prácticamente indetectables de KIN10. De esta manera confirmamos que disponemos líneas con niveles muy bajos de proteína SnRK1, los cuales estarían limitando su actividad, y nos permitirán profundizar en futuros estudios.

Para indagar en esta posible interacción entre la mitocondria y la vía SnRK1, medimos los niveles de actividad SnRK1 en plantas mutantes *CYTc*, utilizando un anticuerpo que reconoce la versión fosforilada de AMPK, y que se ha demostrado que es capaz de reconocer también a SnRK1 de plantas. En la **Figura 21A**, se presenta el *Western Blot* realizado sobre plantas WT y mutantes dobles *cytc-1b2a* y *cytc-1b2b*. Los resultados muestran un marcado aumento en los niveles de P-AMPK en las líneas mutantes, respecto al control WT. Luego evaluamos la mutante simple *cytc-1a*, y utilizamos la mutante *akin10* como control (**Figura 21B**). Nuevamente observamos que la mutante *cytc-1a* tiene mayores niveles de P-AMPK que el control WT. Estos resultados estarían demostrando que antes una disfunción mitocondrial, que disminuye los niveles de ATP, el sensor SnRK1 aumenta su actividad como respuesta a este estrés.

Estos resultados nos impulsaron a realizar líneas de cruza entre las mutantes en *CYTc-1* y mutantes *KIN10*, con el objetivo de disminuir la actividad SnRK1 en estas plantas, y evaluar su respuesta mediante distintos parámetros fenotípicos, metabólicos y moleculares. Esto nos permitiría dilucidar mejor esta conexión que existe entre la mitocondria y la vía SnRK1. Cabe destacar que estos análisis preliminares dieron lugar a un nuevo trabajo de investigación en el marco de la Tesis Doctoral de la Lic. Florencia Coronel, que forma parte del laboratorio actualmente, y que continuará con los diferentes análisis.



**Figura 21. Análisis de la actividad SnRK1 en mutantes simples *cytc-1a* y dobles *cytc-1b2a* y *cytc-1b2b*.** (A, B) *Western Blot* realizado a partir de extractos de proteínas totales de plantas WT, *cytc-1b2a*, *cytc-1b2b* (A), *cytc-1a* y *akin10* (B). Se utilizó un anticuerpo específico anti-P AMPK (*Cell Signalling*, #2531) y anti-actina como control de carga.

## 6.4 Interacción entre el CYTc y la vía TOR

### 6.4.1 Análisis de los niveles de CYTc en plantas mutantes en la vía TOR

#### 6.4.1.1 Evaluación de los niveles de transcritos y proteína

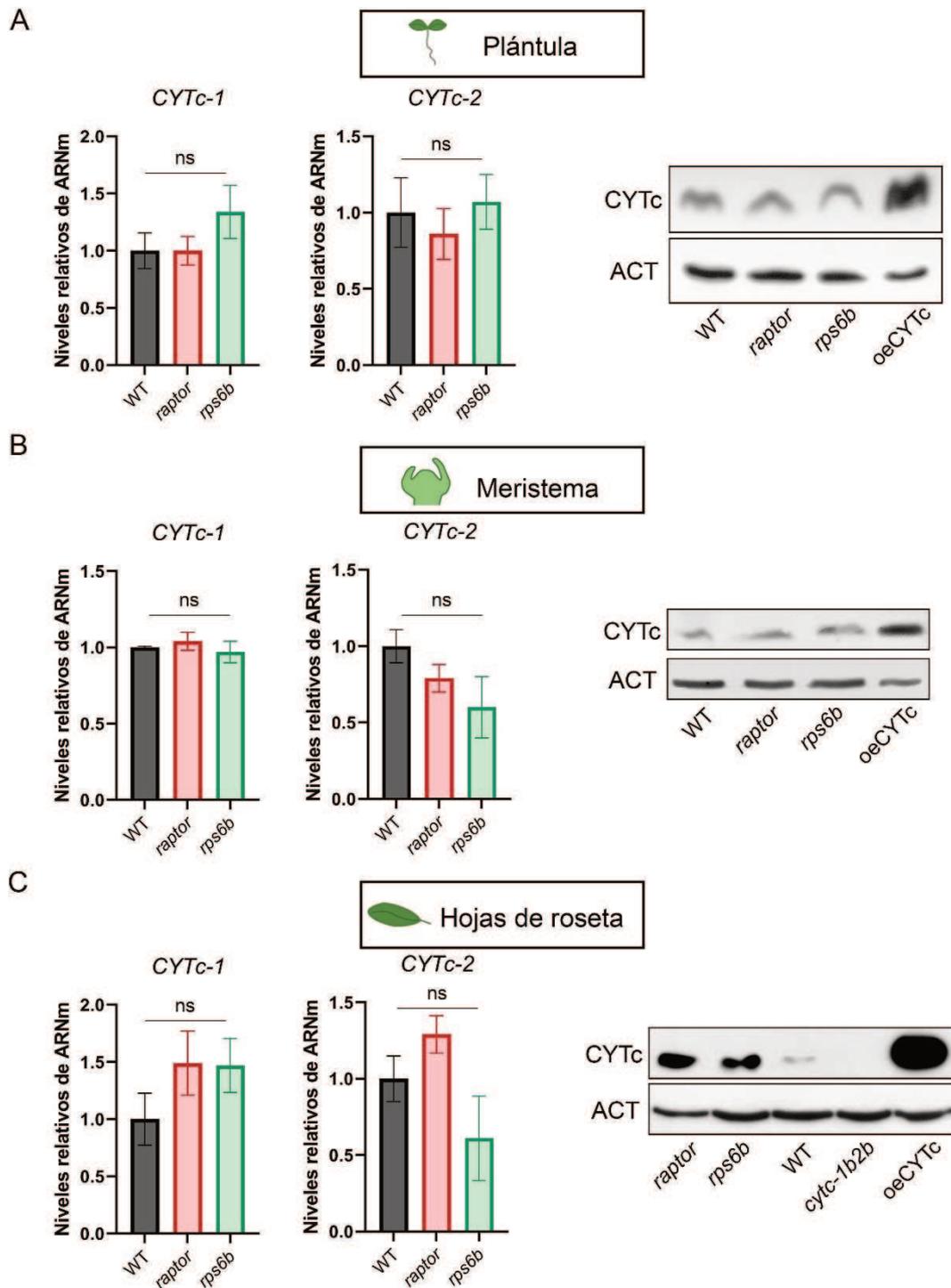
Resultados previos del laboratorio demuestran el rol del CYTc en la regulación de la germinación, crecimiento vegetativo, el desarrollo y vías hormonales en *A. thaliana* (Racca et al., 2018, 2022; Welchen et al., 2012). Asimismo, sabemos que las mitocondrias pueden funcionar como organelas sensoras y señalizadoras del estado energético celular, coordinando el desarrollo a través de la interacción con diferentes vías reguladoras del crecimiento. En este sentido, los nutrientes juegan un papel clave, incluyendo los azúcares, los aminoácidos, el nitrógeno, fósforo y azufre (Ingargiola et al., 2023; Yanlin Liu et al., 2021).

En plantas, la vía TOR es una de las principales vías capaz de percibir el nivel de nutrientes y promover el crecimiento, regulando procesos esenciales en el ciclo de vida de las plantas. Entre ellos podemos mencionar la biogénesis de ribosomas, la traducción de proteínas, la progresión del ciclo celular, la activación de meristemas, respuesta a hormonas, la autofagia y el metabolismo anabólico (Dobrenel et al., 2016; Shi et al., 2018; Van Leene et al., 2019).

Se sabe que mutantes en la vía TOR, tienen defectos en el crecimiento similares a los que observamos para mutantes *cytc-1*, entre los principales podemos destacar; germinación retrasada, crecimiento reducido a nivel de plántula y tejido aéreo, retrasos en el pasaje a estadio reproductivo y alteraciones en el metabolismo de carbohidratos (Deprost et al., 2005, 2007; Y. K. Kim et al., 2014; Salem et al., 2018). Cabe destacar también, que los resultados expuestos previamente relacionados al aumento en el nivel

de aminoácidos, así como en el proceso de autofagia, también forman parte de los fenotipos que muestran mutantes en la vía TOR (Salem et al., 2017). Es por esto que proponemos que existiría una conexión entre la respiración mitocondrial a través del CYTc y la vía TOR.

Comenzamos midiendo los niveles de transcritos de los genes *CYTc-1* y *CYTc-2*, en tejidos de plántulas de 6 días, meristema apical y hojas de roseta de 15 días, utilizando líneas WT y mutantes en *raptor* y *rps6b*. Estos resultados se presentan en la **Figura 22A, B y C (panel izquierdo)**, donde vemos que no hay diferencias significativas para ninguno de los dos genes, en los tejidos analizados. Estos resultados nos permiten decir que TOR no tendría una regulación transcripcional sobre el CYTc.



**Figura 22. Análisis transcripcional de los genes *CYTc-1* y *CYTc-2*, y de los niveles de proteína en plantas mutantes de la vía TOR. (A)** Análisis de los niveles de transcritos de los genes *CYTc-1* y *CYTc-2* en los genotipos WT, *raptor* y *rps6b*. Se extrajo ARN total de plántulas de 6 días de edad, crecidas en placas de Petri con medio MS agar al 0,8% (p/v) en fotoperiodo LD, y se analizaron mediante RT-qPCR (panel izquierdo). Análisis mediante *Western Blot* realizado en extractos de proteínas totales de plántulas crecidas como se detalló previamente, utilizando anticuerpos anti-CYTc (Agrisera #AS08343A) y anti-actina como normalizador (panel derecho). **(B)** Se tomaron muestras de meristema apical del vástago de plantas WT, *raptor* y

*rps6b*. Fueron crecidas en tierra durante 15 días, en ciclo diurno LD. Se extrajo ARN total y proteínas totales para los respectivos análisis de transcritos y proteínas, mencionados en (A). **(C)** Se utilizaron hojas de roseta de plantas crecidas en las condiciones detalladas en (B), y se analizaron los niveles de transcritos de *CYTc-1* y *CYTc-2* (panel izquierdo), y niveles de proteína CYTc (panel derecho). Se añadieron los genotipos *oeCYTc* y *cytc-1b2b*, como control positivo y negativo, respectivamente. Las barras representan la media (+/- EE) de tres réplicas biológicas. EE: error estándar. ns: no significativo.

Posteriormente analizamos los niveles de proteína CYTc mediante *Western Blot*, en los mismos tejidos evaluados previamente (**Figura 22A, B y C, panel derecho**). Utilizamos como control positivo una línea sobreexpresante de CYTc (*oeCYTc*) previamente caracterizada en el laboratorio, y la línea *cytc-1b2b*, que posee mutados ambos genes de *CYTc*. Podemos observar, tanto para el tejido de plántula como para meristema, que las mutantes *raptor* y *rps6b* poseen los mismos niveles de proteína CYTc, que una planta WT. En el caso de hojas de roseta, vemos que ambas mutantes *raptor* y *rps6b*, poseen mayores niveles de proteína CYTc, en comparación con la línea WT. Por lo que podemos decir que, ante una falta de TOR, o de algún componente de la vía, se genera un aumento en los niveles de proteína CYTc. Esto también ha sido observado recientemente en un estudio de proteómica global, realizado por Montes et al. (2022).

#### 6.4.1.2 Efecto de la sobreexpresión de CYTc

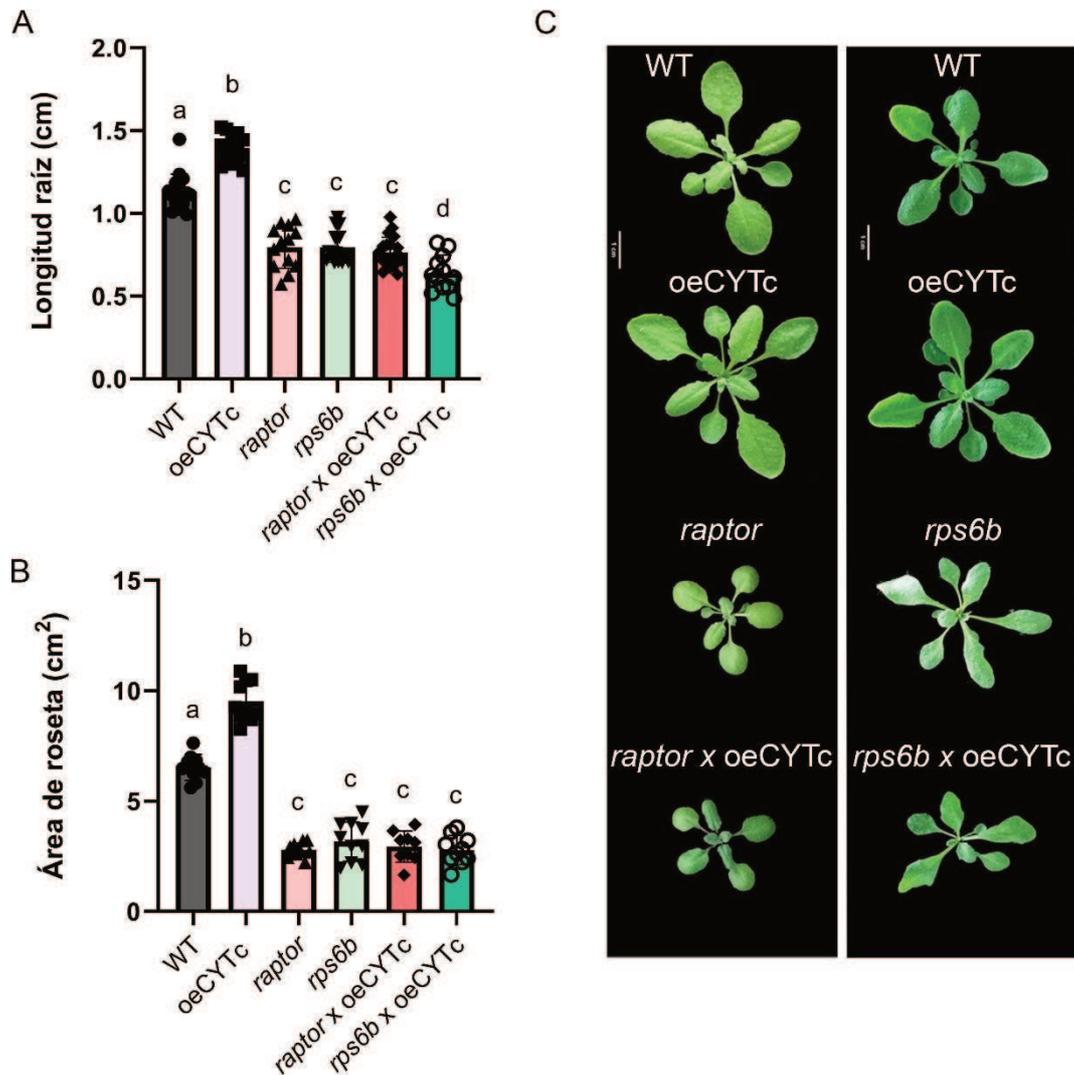
Sabemos por resultados previos del laboratorio, que líneas con mayores niveles de proteína CYTc, presentan fenotipos de mayor crecimiento, tanto a nivel de plántula (raíz e hipocótilo) como en estadio adulto, generando una mayor biomasa de roseta y un adelanto en el tiempo de floración (Racca et al., 2018).

Con el objetivo de continuar indagando en la conexión entre el CYTc y la vía TOR, realizamos experimentos con las líneas mutantes *raptor* y *rps6b*, a las cuales le sobreexpresamos CYTc. Una vez obtenidas las líneas de cruce doble homocigotas, evaluamos parámetros fenotípicos como la longitud de raíz y el área de roseta, los cuales se encuentran dentro de los principales fenotipos afectados y que han sido reportados para las mutantes TOR (G. H. Chen et al., 2018; Salem et al., 2017).

Se muestra en la **Figura 23A**, la cuantificación de la longitud de la raíz de las distintas líneas. Por un lado, vemos que la línea *oeCYTc* presenta una raíz principal más larga, y que las líneas mutantes *raptor* y *rps6b* presentan raíz más corta, respecto a plantas WT, en concordancia con la bibliografía (G. H. Chen et al., 2018; Salem et al., 2017).

Por otro lado, observamos que las líneas de cruce *raptor* x *oeCYTc* y *rps6b* x *oeCYTc*, mantienen el fenotipo de raíz corta, como su respectiva parental mutante.

Luego analizamos el área de roseta, otro de los parámetros que las mutantes en la vía TOR presentan afectado. En la **Figura 23B**, vemos que la sobreexpresión de *CYTc* genera un aumento en el tamaño de la roseta en comparación con el control WT, y pudimos confirmar también, que las mutantes *raptor* y *rps6b*, poseen un menor tamaño de roseta. Al analizar las líneas de cruces, vemos que al igual que lo ocurrido en plántula, el área de roseta es comparable con su respectiva parental mutante. Es decir, que el efecto promotor del crecimiento de *CYTc* no se observa en plantas deficientes en la vía TOR, demostrando que el mismo requiere de una vía TOR intacta. En la **Figura 23C**, se muestran imágenes representativas de las rosetas de cada genotipo, correspondientes a 17 días de edad, crecidas en condiciones óptimas de luz y temperatura, en fotoperiodo de día largo (LD). Se midieron otros parámetros como el tiempo de floración, número de hojas en dicho momento, altura del tallo a distintos tiempos, y producción, los cuales han resultado en el mismo sentido que los mencionados anteriormente. Es decir, en ningún parámetro analizado el *CYTc* ha revertido el fenotipo de crecimiento afectado que tienen las mutantes en la vía TOR.



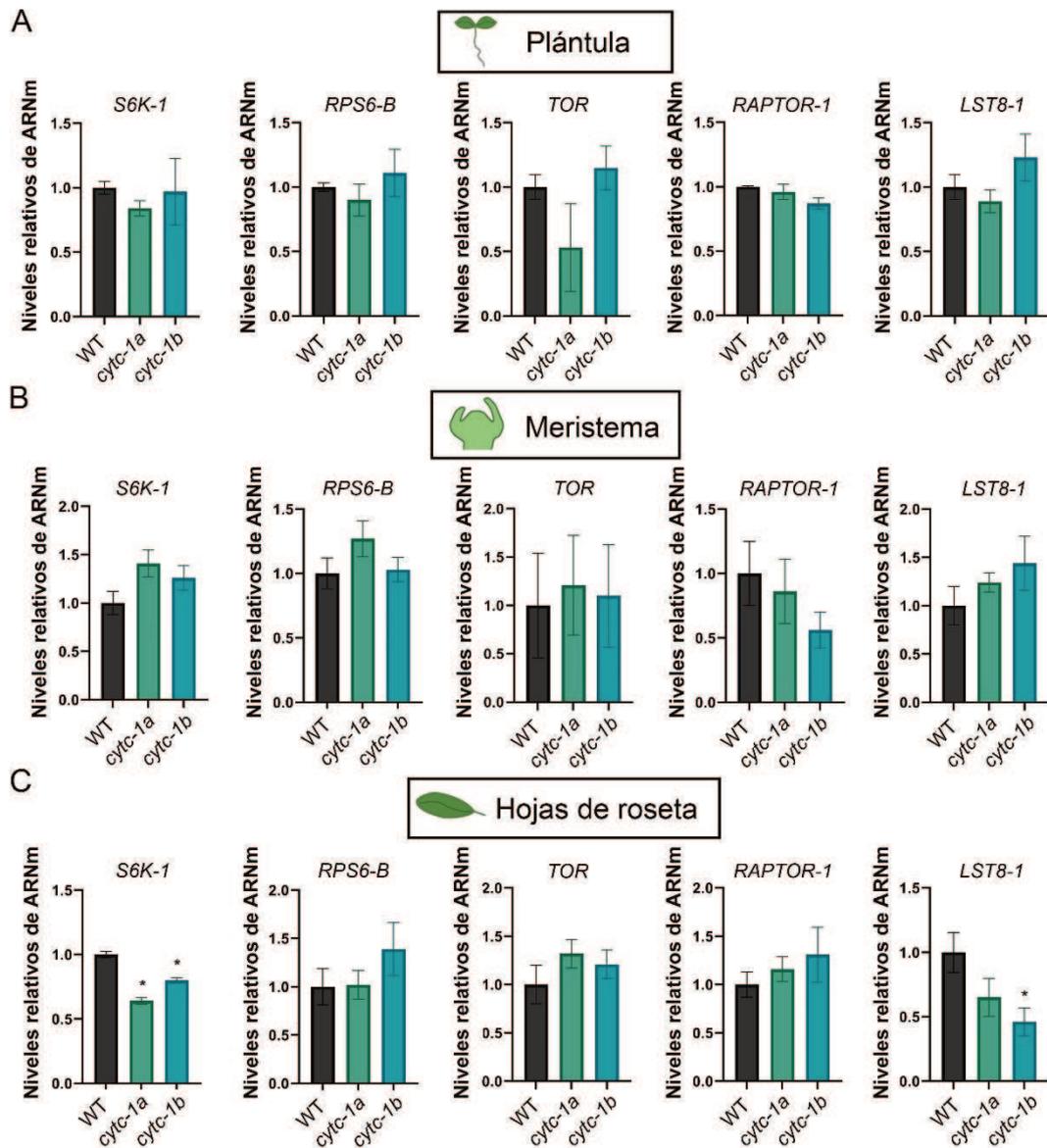
**Figura 23. Caracterización fenotípica en plántula y estadio adulto de líneas, WT, oeCYTc, raptor, rps6b, y las líneas de cruce raptor/rps6b x oeCYTc. (A)** Longitud de raíz (cm) de plántulas de 6 días correspondientes a los siguientes genotipos: WT, raptor, rps6b, oeCYTc y las líneas de cruce raptor x oeCYTc y rps6b x oeCYTc. Las plantas se cultivaron en placas verticales con medio MS agar al 1% (p/v), en un ciclo diurno LD. **(B)** Análisis del área de roseta (cm<sup>2</sup>) de los genotipos antes mencionados. Las plantas fueron cultivadas en tierra durante 17 días en fotoperiodo LD. Las barras representan la media (+/- DE). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (n>12, p<0,05). **(C)** Imágenes representativas de las rosetas correspondientes al ensayo indicado en (B). Barra de escala: 1 cm.

## 6.4.2 Estudio de la vía TOR en plantas mutantes *cytc-1a* y *cytc-1b*

### 6.4.2.1 Análisis transcripcional

Procedimos a realizar el análisis inverso, es decir, analizar cómo se encontraba la vía TOR en mutantes en *CYTc-1*. Comenzamos midiendo los niveles de transcritos mediante qPCR, de los genes que codifican para proteínas del complejo TOR, como *TOR*, *RAPTOR-1* y *LST8-1*, así como también genes que codifican para proteínas que se encuentran corriente abajo en la vía de señalización, como *S6K-1* y *RPS6-B*. Estos análisis los realizamos nuevamente en plántula, meristema apical del vástago y hoja de roseta, de la misma manera que lo hicimos para el análisis de *CYTc*.

En la **Figura 24**, se muestran los resultados de los niveles de transcritos antes mencionados, en plántulas de 6 días (**24A**) y en meristema apical (**24B**), de líneas WT y mutantes *cytc-1*. No observamos diferencias significativas en ninguno de los genes de la vía TOR, entre las mutantes *cytc-1* y el control WT. Luego realizamos el mismo análisis en hojas de roseta (**Figura 24C**), y observamos que las mutantes *cytc-1a* y *cytc-1b*, poseen menores niveles de transcritos del gen de *S6K-1*, en comparación con el control WT. Algo similar ocurrió con el gen *LST8-1*, el cual presentó niveles significativamente más bajos en la mutante *cytc-1b*, pero no así en la mutante *cytc-1a*, donde solo se observó una tendencia. Tomando en conjunto estos resultados, podemos decir que no habría una regulación transcripcional generalizada sobre la vía TOR, causada por la falta de *CYTc*.



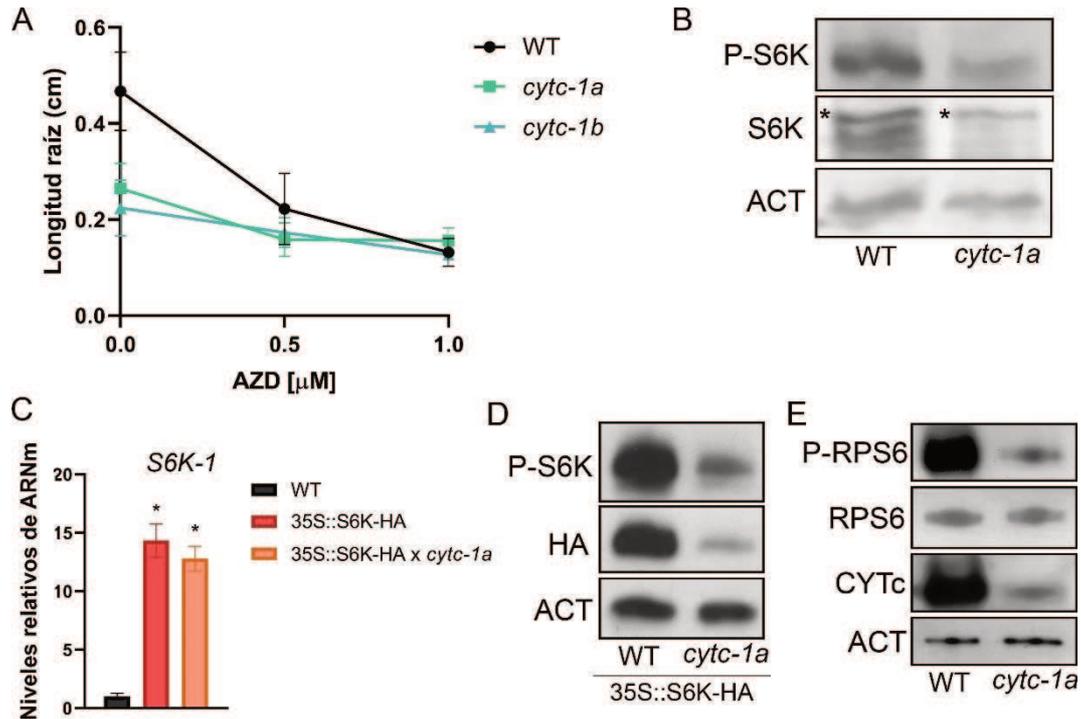
**Figura 24. Cuantificación de los niveles de transcritos de la vía TOR en distintos tejidos de plantas mutantes *cytc-1*.** (A, B, C) Niveles de transcritos de los genes *S6K-1*, *RPS6-B*, *TOR*, *RAPTOR-1* y *LST8-1* evaluados en líneas WT, *cytc-1a* y *cytc-1b*. El análisis se realizó en plántulas de 6 días de edad cultivadas en placas de Petri con medio MS agar al 0,8% (p/v) bajo ciclo diurno LD (A), en meristema apical del vástago (B), y en hojas de roseta (C) de plantas de 15 días crecidas en tierra. Para el análisis de RT-qPCR se utilizó *ACTINA* como gen normalizador. Las barras representan la media (+/-EE) de tres réplicas biológicas. (\*) Asteriscos indican diferencias significativas respecto a las plantas WT, según la prueba t de *Student* ( $p < 0,05$ ,  $n = 3$ ). EE: error estándar.

#### 6.4.2.2 Medidas de la actividad TOR

Realizamos, en primer lugar, un ensayo de sensibilidad al AZD-8055 (AZD), un inhibidor de la vía TOR, el cual compete selectivamente por el ATP. Este parámetro es comúnmente utilizado para identificar componentes moleculares involucrados en la vía TOR (Schaufelberger et al., 2019). Utilizamos las mutantes *cytc-1a* y *cytc-1b*, las expusimos a diferentes concentraciones de AZD, y a las 48 h luego medimos la longitud de la raíz. En la **Figura 25A**, se muestra la curva de sensibilidad en la cual se graficó la longitud de la raíz en función de la concentración de AZD (0, 0.5, 1  $\mu$ M). Entre la condición sin AZD y 0,5  $\mu$ M, es donde ocurre el efecto más fuerte, donde observamos que hay una mayor sensibilidad de la línea WT con respecto a la mutante *cytc-1a*. Este resultado evidencia que las mutantes *cytc-1* son hiposensibles al inhibidor de TOR, ya que el crecimiento de la raíz se afecta menos que la línea WT.

Luego medimos la actividad TOR en las mutantes *cytc-1a* y *cytc-1b*. Una de las formas para medir la actividad TOR, es a través de *Western Blot*, cuantificando los niveles de proteína (fosforilada y no fosforilada) de la S6K, el principal blanco de la quinasa TOR. Para esto utilizamos anticuerpos específicos contra ambas versiones de la proteína S6K, y realizamos la inmunodetección en plántulas de 4 días, tratadas con sacarosa, en las líneas WT y *cytc-1a*. Los resultados del *Western Blot* de la **Figura 25B**, muestran que las mutante *cytc-1a*, posee menores niveles de S6K y P-S6K endógenos, respecto a la planta WT.

Además de la medida de los niveles endógenos de S6K en plantas WT y mutantes *cytc-1a*, realizamos las mismas medidas en una línea de *A. thaliana* sobreexpresante en la proteína S6K (35S::S6K-HA). En esta construcción la proteína S6K se encuentra fusionada a una etiqueta de hemaglutinina (HA), que permite la detección de S6K con un anticuerpo específico anti-HA. Realizamos cruza entre esta línea sobreexpresante de S6K y la línea mutante *cytc-1a*. Luego corroboramos mediante qPCR que los niveles de transcritos de S6K en ambas líneas eran similares. Este resultado se observa en la **Figura 25C**, donde podemos ver que tanto la línea 35S::S6K-HA como la cruza 35S::S6K-HA x *cytc-1a*, tienen niveles comparables de transcritos de *S6K*. Sobre esta misma línea, realizamos un *Western Blot*, utilizando un anticuerpo anti-HA para medir los niveles de S6K, y un anticuerpo específico anti P-S6K (**Figura 25D**). Nuevamente observamos que la mutante *cytc-1a* tiene menores niveles de proteína S6K y P-S6K, respecto a la planta WT.



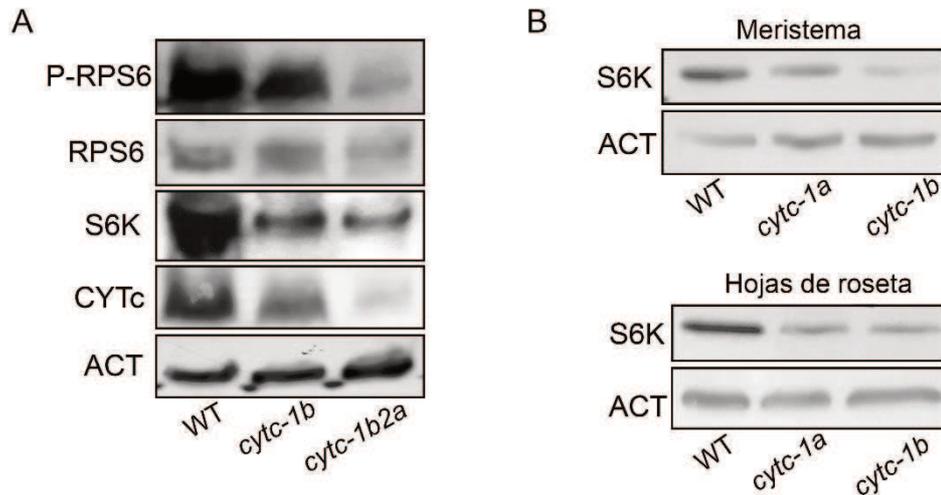
**Figura 25. Medidas de actividad TOR en mutante *cytc-1a*.** (A) Ensayo de sensibilidad a la inhibición de la vía TOR, causada por el AZD-8055 (AZD). Se midió la longitud de la raíz en plántulas WT, *cytc-1a* y *cytc-1b*, crecidas en medio MS líquido durante 3 días y luego suplementadas con sacarosa (20 mM) y diferentes concentraciones de AZD (0,5  $\mu$ M y 1  $\mu$ M) durante 2 días adicionales. (B) *Western Blot* para determinar los niveles de proteína S6K y de su forma fosforilada (S6K-P) en plántulas WT y *cytc-1a*. Las plantas se cultivaron durante 3,5 días en medio MS líquido, seguido de una noche prolongada para el agotamiento de nutrientes (16 h de oscuridad) y luego expuestas a sacarosa 20 mM durante 3 h en fotoperiodo LD. El análisis se realizó en extractos de proteínas totales, utilizando anticuerpos específicos contra S6K (Agrisera #AS121855) y P-S6K (Agrisera #AS132664). (\*) El asterisco representa una banda inespecífica. (C) Análisis de los niveles de transcritos de *S6K-1* en plantas WT, 35S::S6K-HA y la línea de cruce 35S::S6K-HA x *cytc-1a*. Las plántulas se cultivaron durante 6 días en placas de Petri con medio MS agar al 0,8% (p/v) en un ciclo diurno LD. Se extrajo ARN total y se analizó mediante RT-qPCR. Las barras representan la media (+/-EE) de tres réplicas biológicas. (D) *Western Blot* para evaluar los niveles de S6K-HA y P-S6K en plántulas WT y *cytc-1a* en *background* 35S::S6K-HA, cultivadas como se indica en (B). Se utilizaron anticuerpos específicos anti-HA (Roche 11867423001) para medir los niveles de S6K-HA, y anti-P-S6K. (E) *Western Blot* en extractos de proteínas totales de plántulas WT y *cytc-1a*, cultivadas como se indica en (B), para determinar los niveles de proteína RPS6 mediante el uso de anticuerpos específicos (Agrisera #AS194292) y de su isoforma fosforilada (P-RPS6, Agrisera #AS194302). Se utilizó anti-CYTc (Agrisera #AS08343A) como control de las líneas y anti-Actina como control de carga en todos estos experimentos.

Por último, nos interesó evaluar en la mutante *cytc-1a*, los niveles de otros componentes de la vía TOR, que se encuentran corriente abajo de la S6K. Para esto, elegimos la proteína ribosomal S6 (RPS6), la cual es blanco directo de S6K, constituyendo una de las principales vías que regula el proceso de traducción, mediada por el complejo TOR. Medimos los niveles tanto de la versión fosforilada, como de la no fosforilada, los cuales se pueden ver en la **Figura 25E**. En este caso, vemos que los niveles de RPS6 no se encuentran afectados en la mutante *cytc-1a*, pero sí se encuentran disminuidos los niveles de P-RPS6. Estos resultados, están indicando que la falta de CYTc genera una disminución en la vía TOR, que afecta los niveles de proteína S6K no fosforilada, así como de su versión fosforilada, y que posteriormente impactan negativamente en los niveles de fosforilación de RPS6.

Luego decidimos validar en la mutante *cytc-1b* los resultados que obtuvimos previamente en la línea *cytc-1a*. También nos propusimos analizar qué ocurría con la vía TOR en la línea doble mutante *cytc-1b2a*, de manera de conocer si el gen *CYTc-2* también se encontraba involucrado en esta regulación. Para esto realizamos un *Western Blot* a partir de extractos de proteínas totales de plántulas, en el cual medimos los niveles de S6K y utilizamos como marcador de los niveles de actividad TOR, los niveles de fosforilación de la proteína P-RPS6. Como se puede ver en la **Figura 26A**, encontramos que los niveles de S6K se encuentran disminuidos en la misma magnitud en ambas mutantes, respecto a las plantas WT, tal como observamos con la línea *cytc-1a*. Respecto a la actividad TOR, encontramos que los niveles de RPS6 permanecen inalterados, pero sí se encuentran disminuidos los niveles de P-RPS6 en las líneas mutantes, y de forma más acentuada en la línea *cytc-1b2a*.

Al igual que para los experimentos anteriores, decidimos evaluar los niveles de S6K en distintos tejidos. Se muestran en la **Figura 26B**, las imágenes de *Western Blot* obtenidas para los tejidos de meristema (panel superior) y hoja de roseta (panel inferior), en los cuales se midieron los niveles de S6K endógenos. Aquí también podemos ver que ambas mutantes *cytc-1* tienen menores niveles de S6K, en comparación con la línea WT. En estos tejidos también evaluamos la versión fosforilada pero no hemos podido detectarla.

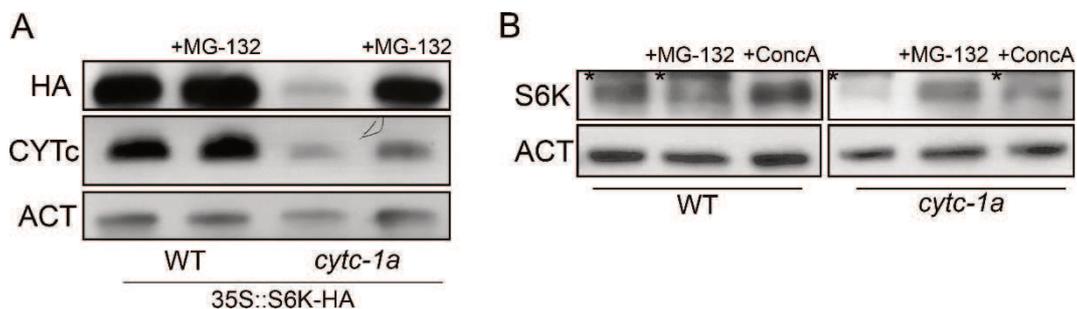
Tomando en conjunto los resultados presentados en la **Figura 25 y 26**, podemos decir que una deficiencia en *CYTc-1* afecta los niveles de S6K, lo que impacta negativamente en su fosforilación y en la actividad de elementos corriente abajo, como RPS6. Esta regulación sería post-transcripcional y ocurre en distintos tejidos, a lo largo del desarrollo de la planta.



**Figura 26. Análisis de la vía TOR en línea mutante simple *cytc-1b* y mutante doble *cytc-1b2a* en diferentes tejidos. (A)** *Western Blot* realizado en extractos de proteínas totales preparados a partir de plántulas de los genotipos WT, *cytc-1b* y *cytc-1b2a*. Las plantas se cultivaron durante 3,5 días en medio MS líquido, seguido de una noche prolongada para el agotamiento de nutrientes (16 h de oscuridad) y luego expuestas a sacarosa 20 mM durante 3 h en fotoperiodo LD. La membrana se incubó con anticuerpos específicos contra CYTc, S6K, RPS6 y P-RPS6. **(B)** Niveles de proteína S6K evaluados mediante *Western Blot* en extractos de proteínas totales de meristema apical (gráfico superior) y en hojas de roseta (gráfico inferior) de líneas WT, *cytc-1a* y *cytc-1b*. Las plantas fueron crecidas en tierra durante 15 días, en condiciones de LD. Se utilizó anti-Actina como normalizador en todos los casos.

Dado los resultados previamente obtenidos, pensamos que podría existir una inestabilidad de la proteína S6K generada por la falta de CYTc. Sabemos que las proteínas poseen una vida media que está determinada por la dinámica entre la síntesis y su degradación. Esta degradación, puede darse principalmente por dos vías, por la vía del proteasoma y a través de la autofagia. Para esto, realizamos en primer lugar, ensayos con MG-132, un inhibidor de la degradación de proteínas vía proteasoma. En la **Figura 27A**, vemos el *Western Blot* de S6K realizado en plantas 35S::S6K-HA, en genotipo WT y mutante *cytc-1a*. Observamos que al tratar con MG-132, la línea WT evidencia un ligero aumento de los niveles de S6K, pero que este aumento es mucho más significativo en la mutantes *cytc-1a*. Algo similar ocurre cuando analizamos los niveles de S6K endógena en líneas WT y *cytc-1a* (**Figura 27B**). Si comparamos la condición control entre WT y *cytc-1a*, nuevamente observamos los menores niveles de S6K en la mutante. Cuando realizamos el tratamiento con MG-132, vemos que para la línea WT no hay una variación significativa respecto a la condición control, pero sí hay un marcado aumento en los niveles de S6K en la línea mutante *cytc-1a*. Luego realizamos un tratamiento con un inhibidor de la degradación vacuolar que ocurre

durante el proceso de autofagia, la Concanamicina A (ConcA). En el caso de la línea WT, se da un ligero aumento en los niveles de S6K, en comparación con la condición control, y en la línea *cytc-1a* observamos un aumento significativamente mayor en presencia de ConcA. Estos resultados, están indicando que en un contexto de deficiencia de CYTc, existe una degradación aumentada de la proteína S6K, tanto vía proteasoma como por autofagia, que permite explicar los menores niveles de S6K que presentan estas plantas. De todas maneras, resta evaluar si el proceso de traducción también se encuentra afectado en las mutantes *cytc-1a*, de manera de poder explicar de forma integral los menores niveles de S6K.



**Figura 27. Evaluación de los niveles de S6K en condición control y frente a la inhibición de la degradación por proteasoma y autofagia. (A)** Evaluación de los niveles de S6K-HA en respuesta al inhibidor del proteasoma MG-132, en extractos de proteínas totales elaborados a partir de plantas WT y *cytc-1a* (ambas en *background* 35S::S6K-HA). Las plántulas se cultivaron durante 4 días en medio MS líquido, en ciclo diurno LD y luego un grupo de plantas fue tratado sólo con sacarosa 20 mM y otro con sacarosa y MG-132 (20  $\mu$ M). Se utilizó Anti-HA para medir los niveles de S6K-HA y anti-CYTc para corroborar la identidad de las líneas. **(B)** *Western Blot* para evaluar los niveles endógenos de S6K en respuesta a MG-132 y concanamicina A (ConcA) (1  $\mu$ M) como inhibidor de la autofagia. Las plántulas se cultivaron como se indica en (A). Se utilizó anti-Actina como normalizador.

### 6.4.2.3 Obtención y análisis de líneas con elevados niveles de TOR

#### 6.4.2.3.1 Evaluación fenotípica y medidas de actividad TOR

De manera inversa, realizamos cruza entre una línea sobreexpresante de TOR (35S::GFP-TOR) (Schepetilnikov et al., 2017) y la línea mutante *cytc-1a*, con el objetivo de restablecer la vía y poder determinar si los defectos en el crecimiento de las mutantes, se deben a una disminución en la actividad TOR. Una vez obtenida la línea de cruce, corroboramos los niveles de proteína TOR, mediante *Western Blot*. En la **Figura 28A** se muestra la imagen correspondiente a la inmunodetección de TOR a

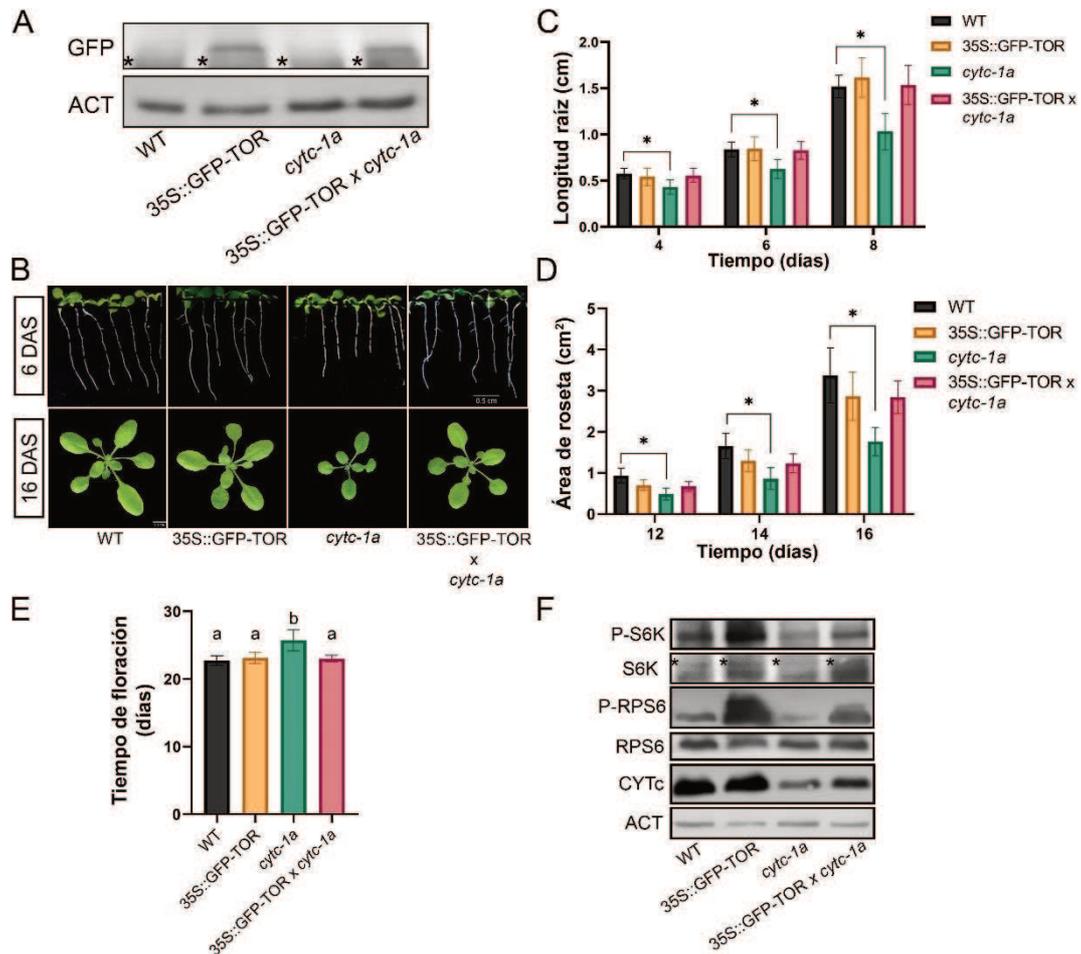
través del uso de un anticuerpo anti-GFP. Podemos ver en esta imagen que detectamos GFP tanto en la línea parental 35S::GFP-TOR (calle 2), como en la línea de cruce con la mutante *cytc-1a* (calle 4), y no así en la línea WT y *cytc-1a*. Se indican con asteriscos bandas inespecíficas que aparecen inmediatamente debajo del tamaño esperado, en todas las calles. De esta manera confirmamos que ambas líneas sobreexpresan TOR, en niveles similares.

Luego procedimos a realizar un análisis fenotípico en distintos estadios de desarrollo. En primer lugar, medimos la longitud de raíz (**Figura 28B, C**) de las líneas WT, *cytc-1a*, 35S::GFP-TOR y 35S::GFP-TOR x *cytc-1a*, a distintos tiempos. Este análisis muestra que el fenotipo de raíces más cortas que presentan las mutantes *cytc-1a*, se revierte a niveles WT luego de sobreexpresar TOR. Posteriormente, evaluamos el área de roseta y el tiempo de floración, para conocer si esta reversión ocurría también en estadios más avanzados del desarrollo. Como se muestra en la **Figura 28B y 28D**, vemos que las líneas 35S::GFP-TOR x *cytc-1a* tienen un área de roseta comparable con el de una planta WT. Lo mismo ha sido observado para el tiempo de floración (**Figura 28E**). En conclusión, vemos que al sobreexpresar TOR en las plantas mutantes *cytc-1a*, se recuperan los fenotipos de crecimiento afectados, como la longitud de la raíz, el tamaño de roseta y el tiempo de floración.

Por último, debíamos confirmar si esta recuperación del crecimiento se debía a una restauración de los niveles de S6K y de la actividad TOR. Para esto realizamos un *Western Blot* en el que medimos S6K y RPS6, tanto sus versiones no fosforiladas como fosforiladas. Además, medimos los niveles de CYTc, para corroborar la identidad de las líneas. Estos resultados se presentan en la **Figura 28F**, donde podemos ver que los niveles de RPS6 son iguales entre los distintos genotipos, tal como habíamos observado en resultados previos. En cuanto a los niveles de P-RPS6 podemos decir que la sobreexpresión de TOR genera un aumento de los niveles de la esta proteína en plantas WT, y que nuevamente la mutante *cytc-1a* presenta menores niveles que las plantas salvajes en idénticas condiciones de crecimiento. Por otro lado, en la línea 35S::GFP-TOR x *cytc-1a* vemos un aumento significativo de los niveles de P-RPS6, en comparación a la mutante *cytc-1a*. Al analizar los niveles de S6K y P-S6K, vemos que la línea 35S::GFP-TOR posee mayores niveles de ambas proteínas respecto a la línea WT, y que en la línea 35S::GFP-TOR x *cytc-1a*, se recuperan significativamente sus niveles en comparación con la mutante *cytc-1a*. Finalmente, con este ensayo pudimos determinar que la recuperación de los distintos parámetros de crecimiento en la mutante *cytc-1a* se deben a un restablecimiento de la vía TOR. Esto incluye tanto los niveles de

S6K, así como también los niveles de P-S6K y P-RPS6, que determinan finalmente la actividad de la vía.

Estos resultados en su conjunto, indican que las mutantes *cytc-1* presentan una disminución en los niveles de S6K, debido a una degradación aumentada de la misma, y que esto limita los niveles de P-S6K afectando así la actividad de la vía TOR. Como consecuencia se genera una disminución en el crecimiento a lo largo de las distintas etapas de desarrollo de la planta.

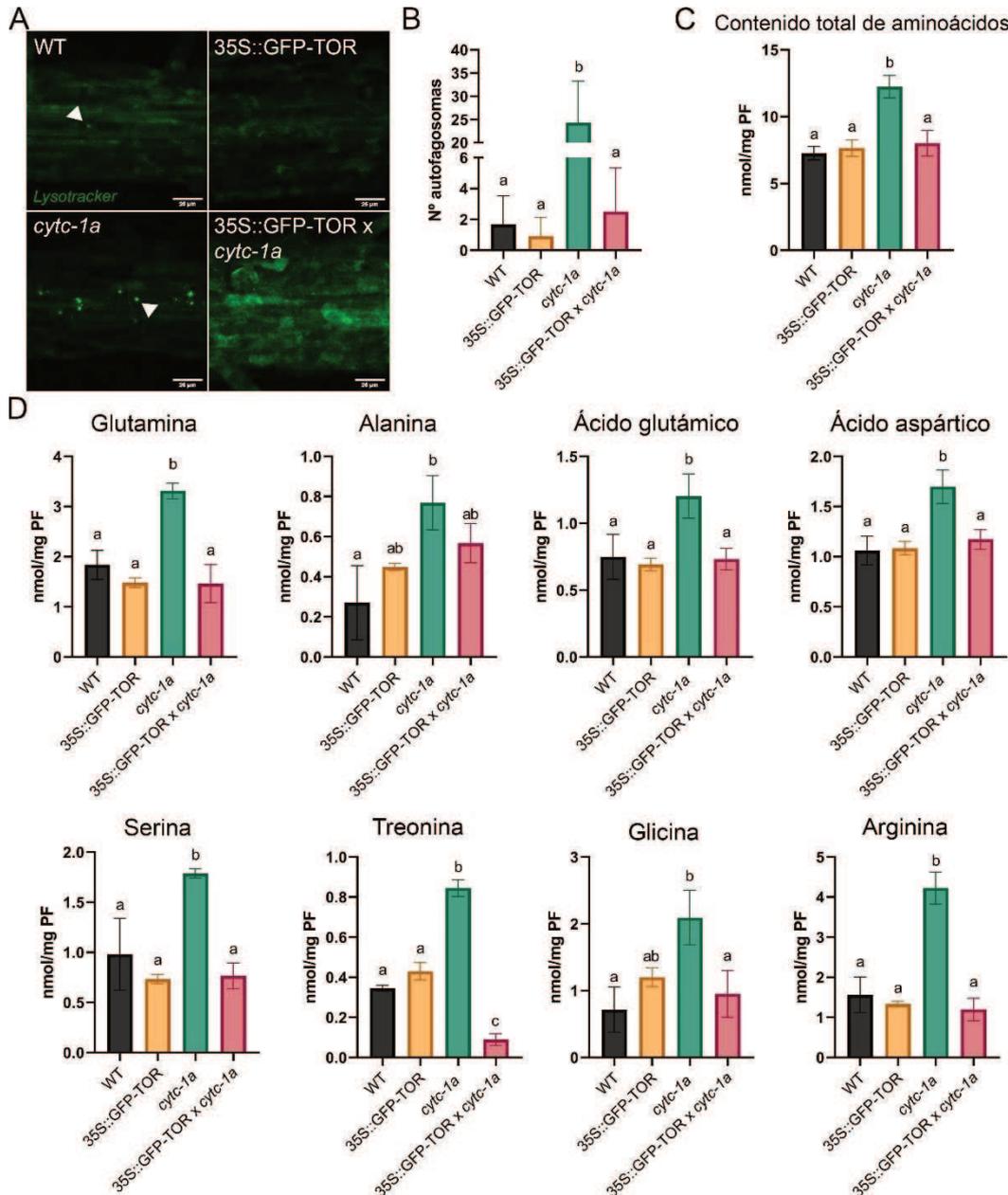


**Figura 28. Caracterización fenotípica y molecular de líneas sobreexpresantes TOR en plantas WT y mutantes *cytc-1a*.** (A) *Western Blot* realizado en extractos de proteínas totales utilizando anticuerpo contra GFP en líneas en WT y *cytc-1a*, en *background* 35S::GFP-TOR. (B) Imágenes representativas de plántulas WT, 35S::GFP-TOR, *cytc-1a* y 35S::GFP-TOR x *cytc-1a*, de 6 días de edad (panel superior), cultivadas en placas verticales con medio MS agar 1% (p/v), en ciclo diurno LD. En el panel inferior se muestran rosetas de las mismas plantas crecidas durante 16 días en tierra, en fotoperiodo LD. DAS: días después de la siembra. Barra de escala: 0,5 cm. (C) Longitud de la raíz (cm) de las plántulas mencionadas en (B). El crecimiento se midió a los 4, 6 y 8 días después de la siembra. Las barras representan la media (+/-DE). (\*) Los asteriscos indican diferencias significativas con las plantas WT, según la prueba t de Student ( $p < 0,05$ ,  $n > 12$ ). (D) Cuantificación del área de roseta de plantas de 12, 14 y 16 días de edad, crecidas en tierra en condiciones de LD. Las barras representan la media (+/-DE). (\*) Los asteriscos indican diferencias significativas con las plantas WT, según la prueba t de Student ( $p < 0,05$ ,  $n > 9$ ). (E) Medida del tiempo de floración de plantas crecidas en tierra como se indicó en (B). Las barras representan la media (+/-DE). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $n > 9$ ,  $p < 0,05$ ). (F) Análisis de la actividad de la vía TOR mediante *Western Blot* en extractos de proteínas totales de plántulas WT, 35S::GFP-TOR, *cytc-1a* y 35S::GFP-TOR x *cytc-1a*. Para el análisis se utilizaron anticuerpos específicos contra S6K, S6K-P, RPS6, RPS6-P y

CYTc. Las plántulas se cultivaron como se detalla en la Fig. 25B. Se utilizó un anticuerpo anti-actina como control de carga en todas las mediciones. (\*) Los asteriscos indican una banda inespecífica.

#### 6.4.2.3.2 Análisis del proceso de autofagia y contenido de aminoácidos

Continuamos evaluando el efecto de la sobreexpresión de TOR en el proceso de autofagia y el contenido de aminoácidos. En la **Figura 29A**, se muestran imágenes representativas de raíces teñidas con el colorante *Lysotracker*. La cuantificación correspondiente se observa en la **Figura 29B**, donde vemos que las mutantes *cytc-1a* presentan mayor número de autofagosomas, demostrando un mayor nivel de autofagia, en concordancia con los resultados previos. Vemos también que la línea 35S::GFP-TOR se comporta como una planta WT, evidenciando un nivel similar de autofagia. Respecto a la sobreexpresión de TOR en las plantas mutantes *cytc-1a*, observamos que disminuye el número de autofagosomas a un nivel WT, es decir que se normaliza el nivel de autofagia. De igual manera, al analizar el contenido total de aminoácidos (**Figura 29C**), vemos que la sobreexpresión de TOR también es capaz de reducir a niveles WT el contenido de los mismos. Analizamos el perfil individual de aminoácidos, como se muestra en la **Figura 29D**, donde pudimos cuantificar 8 aminoácidos, de los cuales en su mayoría se vieron normalizados a nivel WT en la línea 35S::GFP-TOR x *cytc-1a*, a excepción de la alanina. De esta manera concluimos que, los niveles aumentados de autofagia y de aminoácidos en las mutantes *cytc-1*, son consecuencia de una disminución en la actividad de la vía TOR.



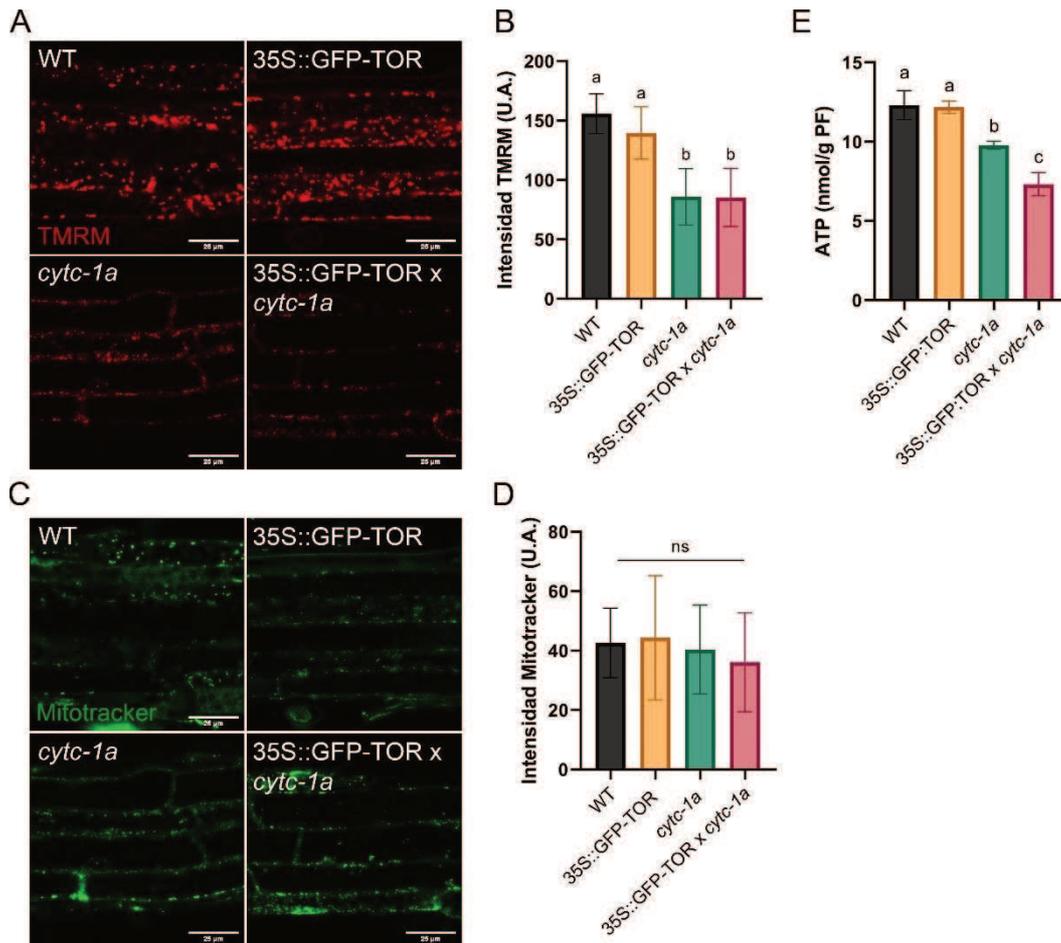
**Figura 29. Medida del nivel de autofagia y contenido de aminoácidos, en líneas sobreexpresantes TOR en plantas WT y mutantes *cytc-1a*.** (A) Imágenes representativas adquiridas por microscopía confocal de raíces de 5 días de edad. Se utilizaron plantas WT, *cytc-1a*, 35S::GFP-TOR y la línea 35S::GFP-TOR x *cytc-1a*, teñidas con *LysoTracker Green* 1  $\mu$ M. La flecha indica los autofagosomas. Las plantas se cultivaron en placas verticales con medio MS agar al 1% (p/v) y sacarosa 1% (p/v), en ciclo diurno LD. Barras de escala: 25  $\mu$ m. (B) Cuantificación del número de autofagosomas correspondientes al experimento mostrado en (A). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $n > 10$  raíces,  $p < 0,05$ ). (C) Contenido total de aminoácidos (nmol/mg PF) determinado en los mismos genotipos y condiciones de crecimiento mencionados en (A). Letras diferentes indican diferencias significativas basadas en la prueba de Tukey (3 réplicas biológicas,  $p < 0,05$ ). (D) Perfil de

aminoácidos determinado por HPLC en plántulas WT, *cytc-1a*, 35S::GFP-TOR y 35S::GFP-TOR x *cytc-1a* crecidas como se indica en (A). Letras diferentes indican diferencias significativas basadas en la prueba de Tukey (4 réplicas biológicas,  $p < 0,05$ ).

#### 6.4.2.3.3 Evaluación de parámetros mitocondriales

Para finalizar el análisis con respecto a la conexión entre la respiración mitocondrial y la vía TOR, determinamos el potencial de membrana mitocondrial y el contenido de ATP, en las líneas WT y *cytc-1a* con sobreexpresión de TOR. Tenemos en la **Figura 30A**, las imágenes de microscopía confocal correspondientes a la tinción con el colorante TMRM. Según las cuantificaciones realizadas (**Figura 30B**), podemos ver que no hay diferencias entre la línea 35S::GFP-TOR y la WT, y que la línea mutante *cytc-1a* posee el potencial de membrana mitocondrial afectado, como habíamos observado previamente. Al observar la línea 35S::GFP-TOR x *cytc-1a* vemos que el potencial de membrana no se modifica al sobreexpresar TOR, es decir continua afectado. En la **Figura 30C** y **D** se muestran las imágenes y la cuantificación correspondientes a la tinción con el colorante *Mitotracker*, utilizada como control, la cual evidencia una intensidad similar en todos los genotipos, avalando los resultados observados para el TMRM.

Por último, cuantificamos el contenido de ATP (**Figura 30E**), y vemos que la sobreexpresión de TOR en las mutantes *cytc-1a*, disminuye aún más los niveles bajos de ATP que presentan las mutantes *cytc-1a*. Podemos concluir que la sobreexpresión de TOR, restaura el crecimiento de las mutantes *cytc-1*, disminuyendo los niveles de autofagia y aminoácidos, pero no restaura los parámetros mitocondriales, por lo que podríamos decir que el crecimiento se restablece a expensas del consumo de ATP.



**Figura 30. Determinación del potencial de membrana y del contenido de ATP, en líneas WT y *cytc-1a* con mayores niveles de TOR (35S::GFP-TOR).** (A) Evaluación del potencial de membrana mitocondrial. Se adquirieron imágenes representativas de raíces de 5 días, mediante microscopía confocal. Las plantas fueron cultivadas como se indica en la Fig. 29A, y fueron teñidas con TMRM 1  $\mu$ M. Barras de escala: 25  $\mu$ m. (B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de TMRM observada en (A). Las barras representan la media de la intensidad de fluorescencia (+/- DE), analizado con el software Fiji. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $n > 10$  raíces,  $p < 0,05$ ). (C) Imágenes representativas adquiridas mediante microscopía confocal de las mismas raíces mostradas en (A), teñidas con el marcador mitocondrial *Mitotracker Green* (1  $\mu$ M). Barras de escala: 25  $\mu$ m. (D) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de *Mitotracker Green* observada en (C). Las barras representan la media de la intensidad de fluorescencia (+/- DE), analizado con el software Fiji ( $n > 12$  raíces). ns: no significativo. (E) Cuantificación del contenido total de ATP medido por HPLC en plántulas de 4 días cultivadas y tratadas con sacarosa como se indica en la Fig. 10E. Letras diferentes indican diferencias significativas basadas en la prueba de Tukey (3 réplicas biológicas,  $p < 0,05$ ).

## 7. Discusión de Resultados

### 7.1 Regulación del crecimiento y metabolismo a través del CYTc

Las plantas coordinan su crecimiento y metabolismo en función de la disponibilidad de nutrientes y la energía proporcionada principalmente por la maquinaria fotosintética del cloroplasto y por la fosforilación oxidativa mitocondrial. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos dedicados a entender cómo las mitocondrias detectan o “sensen” los requerimientos de energía para asegurar el crecimiento y/o las respuestas al estrés (señales anterógradas), y cómo comunican su estado energético-metabólico al resto de la célula (señales retrógradas) para una coordinación adecuada y controlada de todos los procesos celulares, estos procesos no están aun completamente dilucidados (De Clercq et al., 2013; Ng et al., 2013, 2014; Welchen et al., 2021; Welchen & Gonzalez, 2021). En este trabajo, nos propusimos comprender mejor cómo se establece la comunicación entre las mitocondrias y la vía reguladora del crecimiento mediada por el complejo TOR, utilizando plantas con niveles alterados de la hemoproteína CYTc, un componente esencial de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (**Figura 3**).

#### 7.1.1 ¿Cuáles son las señales que regulan el crecimiento y desarrollo en plantas? Los aminoácidos como moléculas señal

Durante el crecimiento y desarrollo de las plantas, convergen diferentes vías de señalización, encargadas de percibir la disponibilidad de nutrientes y desencadenar respuestas que derivan hacia organelas como las mitocondrias, cloroplastos y núcleo (Welchen et al., 2021). De esta manera, se genera una respuesta orquestada que le permite al organismo crecer en condiciones óptimas, así como también hacer frente a situaciones adversas. Cambios en la producción de energía proveniente de la mitocondria, pueden afectar la actividad de las diferentes vías de señalización, representadas por la HK1, la vía TOR y la vía de estrés mediada por SnRK1 (Crepin & Rolland, 2019; Pedrotti et al., 2018; Welchen et al., 2021; Xiong et al., 2013).

En trabajos previos del laboratorio, demostramos la importancia del CYTc durante el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana*. Se observó que una deficiencia total de CYTc es letal a nivel embrionario (Welchen et al., 2012), y también se demostró que los niveles de CYTc regulan la germinación, el crecimiento del tejido aéreo, la transición de estadio vegetativo a reproductivo, así como también la homeostasis de GA (Racca et al., 2018, 2022).

Particularmente en este trabajo, demostramos que plantas mutantes en *CYTc-1*, uno de los dos genes codificantes para CYTc en *A. thaliana*, tienen afectado el crecimiento de la raíz principal, aún en presencia de azúcares (**Figura 10 y 11**). Así, las raíces de plantas mutantes *cytc-1* son más cortas, tienen una menor tasa de crecimiento y, si bien no son parte de los resultados de este trabajo de tesis, observaciones realizadas en nuestro laboratorio demostraron que tienen afectadas tanto el número como el tamaño de las células de todas las regiones que comprenden la raíz principal (*Lic. Facundo Roldán, comunicación personal*). Esto surge una alteración en las señales y mecanismos que conectan la energía con el crecimiento, ya que aun en presencia de azúcares (si la causa fuera enteramente una disminución en los sustratos para proveer mayor energía) esta alteración no es corregida en plantas mutantes *cytc-1*. En este sentido, no observamos cambios en los niveles de proteína AOX1/2 ni en los niveles de transcripto de la vía de señalización MRR (**Figura 12**), la cual se conoce que se induce después de un bloqueo severo en la cadena respiratoria dependiente de CYTc (Ng et al., 2013, 2014). Probablemente, esto indica que los defectos leves en la respiración dependiente de CYTc se transmiten al resto de la célula de forma independiente de la vía MRR.

Las mitocondrias, funcionan como organelas altamente dinámicas, cumpliendo funciones esenciales, como la producción de energía en forma de ATP, mediante el proceso de fosforilación oxidativa. Para que este proceso ocurra correctamente, es necesario un adecuado potencial electroquímico de membrana, otorgado por la distribución diferencial de los iones a los lados de la membrana interna mitocondrial. Cuando las mitocondrias se dañan, el potencial de membrana se afecta, y como consecuencia se desencadenan múltiples respuestas que buscan reparar este daño o bien degradar la organela completa, mediante el proceso de mitofagia (Palikaras et al., 2018; Pickles et al., 2018). Se ha demostrado en diversos organismos eucariotas, que mutantes en proteínas o complejos mitocondriales, evidencian despolarización de la membrana interna mitocondrial, y que esto conlleva a la activación de mecanismos y respuestas adaptativas que buscan atenuar el estrés (Anichtchik et al., 2008; S. Liu et al., 2021; H. L. Wang et al., 2011). En este sentido, se le otorgó un rol clave a distintas proteínas mitocondriales, en el mantenimiento del potencial de membrana. Particularmente en plantas, se le atribuyó recientemente a la proteína mitocondrial FMT (*“Friendly”*), una función reguladora del proceso de mitofagia, desencadenada por una despolarización de la membrana interna mitocondrial (Ma et al., 2021). Durante nuestro trabajo determinamos que ante una deficiencia de *CYTc-1*, la membrana mitocondrial

se despolariza, afectando la producción de ATP (**Figura 10**), y por ende generando un menor crecimiento de la raíz.

Resultados previos del laboratorio demuestran que en hojas de roseta de planta adulta, las mutantes dobles en *CYTc-1* y *CYTc-2*, presentan una mayor acumulación de almidón y de azúcares solubles, así como también evidenciaron un aumento en el contenido de los aminoácidos fenilalanina, valina, leucina e isoleucina (Racca et al., 2018). Al evaluar cómo se encontraban estos parámetros en plántulas de las mutantes simples *cytc-1*, encontramos llamativamente que el metabolismo del carbono se encontraba intacto, tanto los niveles de almidón, de sacarosa, glucosa y fructosa (**Figura 13**). De forma opuesta, observamos que el contenido de aminoácidos libres se encontraba aumentado en las mutantes *cytc-1* (**Figura 14**).

Así, nuestros resultados sugieren que en el estadio de desarrollo de plántulas, ante una deficiencia en CYTc y en la función mitocondrial (representada por una alteración en el potencial de membrana y una disminución en los niveles de ATP), no son las reservas energéticas ni las fuentes de carbono lo que aumentan como forma de sostener el crecimiento, sino que serían los niveles de aminoácidos libres (**Figura 14**). Esto ha sido sugerido previamente por Hildebrandt et al. (2015) en otras especies, donde los aminoácidos aumentarían ante una señal de déficit nutricional o “starvation” y de esta forma posibilitarían el crecimiento, en condiciones donde la energía se vuelve un factor limitante.

### 7.1.2 La autofagia como respuesta frente a la “señal de alarma”

Ante diferentes situaciones de estrés, como pueden ser la limitación de nutrientes, las plantas son capaces de activar el proceso de autofagia, mediante el cual pueden degradar macromoléculas u organelas para obtener energía, así como también eliminar compuestos tóxicos para mantener la homeostasis celular (Kacprzak & Van Aken, 2022; Soto-Burgos & Bassham, 2017; Thompson et al., 2005). Como resultado de nuestro análisis observamos que las plantas mutantes *cytc-1*, tienen aumentado el proceso de autofagia en condiciones basales (**Figura 15 y 16**). Bajo estas condiciones, la célula es capaz de degradar proteínas y obtener aminoácidos libres, lo que explicaría también el alto contenido de aminoácidos observado en las mutantes (Ishizaki et al., 2006; Kacprzak & Van Aken, 2022). Esta podría ser una forma que tienen las mutantes *cytc-1*, de responder al daño en la cadena de transporte de electrones y a la falta de energía, ya que los aminoácidos libres pueden funcionar como fuente alternativa de electrones

para la respiración mitocondrial (Araújo et al., 2011; Heinemann & Hildebrandt, 2021; O'Leary et al., 2019).

Aunque se sabe que la autofagia disminuye en ausencia de estrés, nosotros observamos que las plantas mutantes *cytc-1* mantienen aumentado este proceso cuando se cultivan en presencia de una fuente de carbono exógena, como la sacarosa. Estas evidencias nos permiten proponer que en las plantas con deficiencia en CYTc se activaría una señal de “starvation” o de “alarma” que no estaría directamente relacionada con la disponibilidad de nutrientes como el carbono. Además, consideramos la posibilidad de que la inducción de la autofagia en las mutantes *cytc-1* pueda causar un defecto en el crecimiento debido a la degradación de los componentes celulares y la alteración del metabolismo.

Por otro lado, no descartamos la posibilidad de que la autofagia esté funcionando como una fuente de energía alternativa en estas condiciones donde la mitocondria se encuentra alterada. Sin embargo, al suprimir la autofagia en las plantas mutantes *cytc-1* mediante cruces con mutantes del proceso de autofagia que nos permitieron bloquear esta vía, vemos que el crecimiento de las mutantes *cytc-1* permanece igualmente afectado (**Figura 18**). Esto estaría demostrando que la autofagia incrementada no está causando efectos deletéreos en el crecimiento de las plantas, pero que tampoco constituye una fuente de energía esencial en estas condiciones, o al menos no alcanza a suplir el aporte normal que recibirían las plantas salvajes con niveles de CYTc intactos o normales. Asimismo, observamos que al inhibir el proceso de autofagia los niveles de aminoácidos se normalizaron (**Figura 17**), confirmando por un lado que la fuente de aminoácidos aumentados en las mutantes *cytc-1* es la autofagia, y por otro, que los aminoácidos tampoco están funcionando como una fuente de carbono o energía adicional para corregir los defectos de crecimiento observados en estas plantas deficiente en CYTc-1.

Sin embargo, la autofagia sí parece cobrar un rol relevante para las mutantes *cytc-1*, cuando son sometidas a estrés nutricional como el déficit de carbono, evidenciando una mejor respuesta fenotípica y fisiológica a este estrés nutricional (**Figura 19**). En este sentido, previamente demostramos en el laboratorio que las mutantes dobles deficientes en CYTc, tiene un ingreso tardío al proceso de senescencia natural (Racca et al., 2018), respaldando la idea que las plantas con deficiencia de CYTc tienen una mayor resistencia a las condiciones de estrés por nutrientes. Algo similar fue observado por Mair et al. (2015), en plantas de *A. thaliana*, donde vieron que mutantes en el factor de transcripción bZIP63, muestran una mayor resistencia a la senescencia inducida por oscuridad. También demuestran que este factor de transcripción es fosforilado y

activado por SnRK1, en un contexto de baja energía, de forma de activar respuestas transcripcionales y adaptarse a una condición de privación de nutrientes.

## 7.2 Interacción entre el CYTc y la vía TOR

### 7.2.1 La deficiencia en CYTc-1 impacta en los niveles de activación de TOR

Después de un análisis exhaustivo del fenotipo de plantas deficientes en *CYTc-1* (**Figura 10-16**) y dobles mutantes *CYTc-1* y *CYTc-2* (Racca et al., 2018, 2022; Welchen et al., 2012), notamos que comparten características específicas que han sido reportado previamente en plantas con niveles reducidos de proteínas de la vía TOR. Estas características incluyeron crecimiento reducido, retraso en el paso a la etapa reproductiva y retraso en el inicio del período de senescencia (G. H. Chen et al., 2018; Deprost et al., 2007; Salem et al., 2017), aumento del contenido de aminoácidos libres (Caldana et al., 2013; Cao et al., 2019; Forzani et al., 2019) y aumento de la autofagia basal (Yimo Liu & Bassham, 2010).

Asimismo, observamos que las plantas con niveles reducidos de CYTc mostraron una consistente hiposensibilidad a los tratamientos químicos para inhibir la vía TOR (**Figura 25**), lo que podría ser indicio de una actividad de TOR reducida (Belda-Palazón et al., 2022).

Al evaluar la actividad de la vía TOR en plantas deficientes en *CYTc-1*, observamos que efectivamente la vía se encuentra disminuida, evidenciado tanto por los menores niveles de la proteína S6K y de las variantes fosforiladas P-S6K, así como de su blanco directo P-RPS6 (**Figura 25**). Esta activación reducida de la vía TOR podría ser probablemente la razón que genera el crecimiento defectuoso en las mutantes *cytc-1*, así como el aumento de la autofagia y del contenido de aminoácidos. Esto también se ve avalado por el fenotipo que genera la sobreexpresión de TOR en las mutantes *cytc-1*, donde parámetros como el crecimiento de la raíz, área de roseta, el nivel de aminoácidos, y el nivel de autofagia, se vieron normalizados a niveles WT (**Figura 28 y 29**). Sin embargo, los parámetros relacionados con el metabolismo energético mitocondrial, como el potencial de membrana y los niveles de ATP, no se restablecen mediante la sobreexpresión de TOR (**Figura 30**). De hecho, se observaron niveles más bajos de ATP en plantas 35S::GFP-TOR x *cytc-1a* en comparación con sus respectivos parentales, lo que indica que el consumo de ATP posibilitaría el crecimiento en las mutantes después de la expresión de GFP-TOR. Un estudio reciente de Dai et al. (2022), sugiere que la vía TOR es esencial para controlar la producción fisiológica de ATP en

células vegetales. En este sentido, nuestras observaciones sugieren que la mejora en el crecimiento en las plantas 35S::GFP-TOR x *cytc-1a* se logra a expensas de un mayor consumo de ATP. Si bien no determinamos completamente el mecanismo por el cual la normalización de la actividad TOR restablece el crecimiento, está claro que no se debe a un aumento en los niveles de ATP.

Por lo tanto, postulamos que se activan otras señales como consecuencia del restablecimiento de TOR, y que serían responsables de restaurar el crecimiento en plantas deficientes en CYTc. Los beneficios potenciales de una mayor absorción y utilización de nitrógeno (Lutt & Brunkard, 2022), un metabolismo optimizado (Ingargiola et al., 2023) y las vías hormonales (Liao et al., 2023) se encuentran entre las posibles explicaciones que nos interesan evaluar en trabajos futuros.

### 7.2.2 ¿Cómo se establece la comunicación entre la mitocondria y TOR?

Se ha descubierto que la bioenergética mitocondrial y la producción de ATP afectan la actividad de TOR en mamíferos, según demostró S. G. Kim et al. (2013). Por su parte, la evidencia de una conexión entre la actividad mitocondrial y la vía TOR en plantas fue sugerida inicialmente a partir del uso de diferentes tipos de inhibidores de OXPHOS, donde se demostró una falla en la activación de TOR en respuesta a glucosa (Dai et al., 2022; Riegler et al., 2021; Y. Wang et al., 2020; Xiong et al., 2013; N. Zhang et al., 2019). Además, Brunkard et al. (2020), estudiaron plantas mutantes en la proteína mitocondrial *increased size exclusion limit 3 (ise3)*, que muestra un transporte alterado a través de los plasmodesmos. Si bien la pérdida de función de ISE3 causa letalidad embrionaria, se observó una activación deficiente de TOR cuando ISE3 fue silenciado post-transcripcionalmente utilizando VIGS (*virus-induced gene silencing*) en hojas de *A. thaliana*. Se sabe que el uso de agentes químicos y VIGS puede causar efectos secundarios debido a la inhibición inespecífica de otros procesos celulares. Por otro lado, las condiciones empleadas no serían las más adecuadas ya que no permiten discriminar entre situaciones en las que la función mitocondrial se ve gravemente afectada y situaciones más "fisiológicas" en las que los cambios en la función mitocondrial son compatibles con el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Nuestro estudio muestra que una deficiencia en un transportador de electrones directamente involucrado en la respiración mitocondrial y el suministro de energía afecta la actividad TOR, y que esto es la causa principal de los cambios observados en el crecimiento y el metabolismo de las plantas.

Vale la pena preguntarse si los niveles más bajos de actividad mitocondrial impactan en la actividad de la proteína TOR, lo que resulta en niveles más bajos de P-S6K, o si lo hace directamente sobre la S6K.

Nuestros experimentos demostraron que al sobreexpresar TOR en las líneas mutantes *cytc-1* los niveles de S6K y P-S6K se normalizaron, sin recomponer la actividad mitocondrial y el contenido de ATP (**Figura 28 y 30**). Esto nos ayudó a comprender, por un lado, que la actividad mitocondrial se encuentra corriente arriba de la vía TOR, y que el ATP podría ser la señal que los conecta. Y, por otro lado, entendemos que los menores niveles de P-S6K se deben a una menor actividad de la proteína quinasa TOR, como así también a los menores niveles de S6K, generados por una señal que desencadena su degradación. Sin embargo, la reducción en los niveles de proteína S6K no se había informado previamente en plantas mutantes con activación de TOR reducida (Dai et al., 2022; Scarpin et al., 2020; Van Leene et al., 2019; N. Zhang et al., 2019), a excepción del trabajo de Brunkard et al. (2020), donde sugieren que la disminución de los niveles de S6K puede ser consecuencia de una disminución en la actividad de TOR que afecta su estabilidad.

En este sentido, nuestros resultados mostraron que la inhibición de la actividad del proteasoma en mutantes *cytc-1* condujo a un aumento sustancial en los niveles endógenos de S6K así como también en la línea sobreexpresante S6K-HA (**Figura 27A**). Resultados similares observamos al inhibir la degradación vacuolar con ConCA, donde también aumentaron significativamente los niveles de proteína S6K (**Figura 27B**), sugiriendo que se degrada vía proteasoma y también mediante autofagia.

Un estudio reciente sugirió que la vía TOR juega un papel crucial en la regulación de la respiración y el metabolismo mitocondrial, definiendo el destino final de los aminoácidos entre el catabolismo y la producción de energía a través de la respiración, o las rutas anabólicas a través de la síntesis de proteínas (O'Leary et al., 2019). Este estudio propuso que, en las plantas, ciertos aminoácidos activan TOR para afectar el equilibrio entre las vías catabólicas y anabólicas, similar a las observaciones realizadas en animales. En nuestro caso, se observó una menor actividad de la vía TOR en plantas con deficiencia de CYTc incluso cuando presentan un mayor contenido de aminoácidos libres. Esto sugiere una desconexión entre los niveles de aminoácidos y la activación de la vía TOR, probablemente porque la actividad mitocondrial es necesaria para la activación de TOR por aminoácidos. Además, se demostró que RAPTOR1b está localizado en las mitocondrias, y que tanto los niveles de ATP como el potencial de membrana mitocondrial se reducen en mutantes de *raptor1b* o en plantas expuestas a AZD (Dai et al., 2022). De manera similar, en mamíferos se vio que TOR se localiza

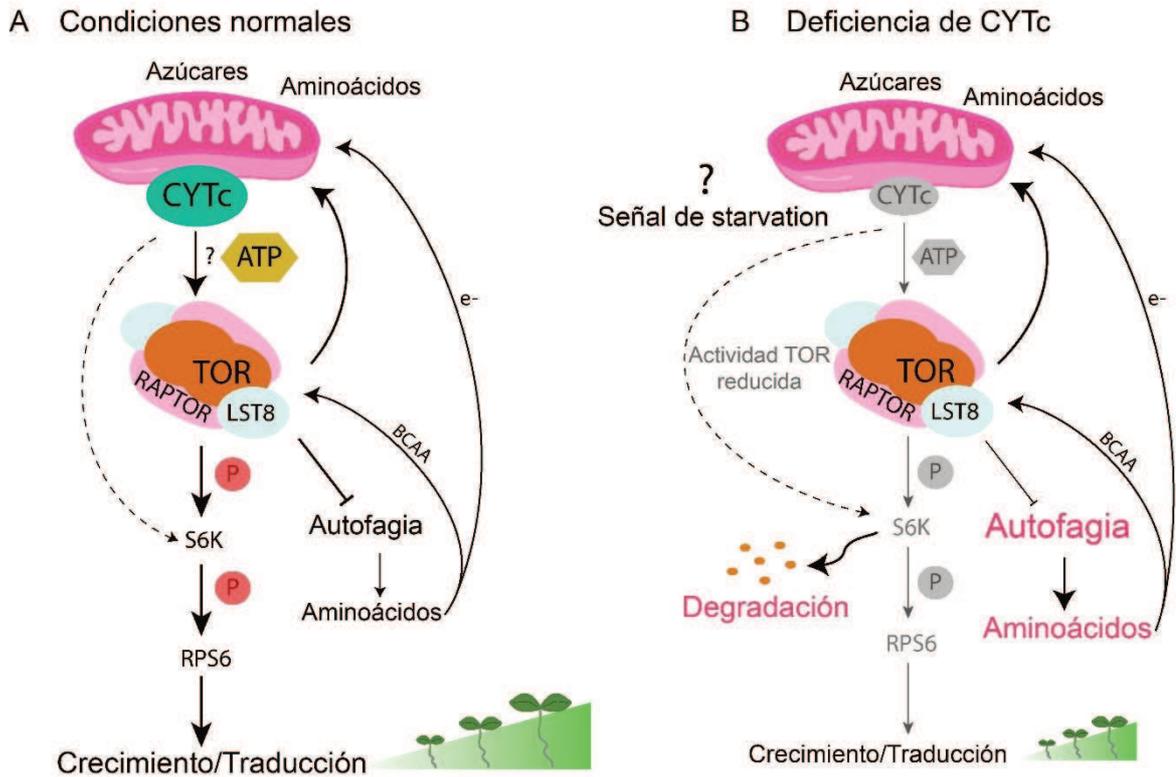
cerca de la membrana mitocondrial externa e interactúa directamente con proteínas ubicadas cerca o sobre las mitocondrias para afectar su función (Ramanathan & Schreiber, 2009). Se reportó también que TOR estimula las funciones mitocondriales al modular la transcripción de genes de proteínas mitocondriales, además de controlar la traducción de proteínas ribosomales mitocondriales y componentes de los complejos respiratorios I y V (Cunningham et al., 2007). Por su parte, se ha sugerido que la regulación de la traducción de proteínas mitocondriales puede ser una vía común utilizada por TOR para controlar las funciones mitocondriales en mamíferos y plantas (Scarpin et al., 2020).

Estos resultados establecen un vínculo físico y funcional entre el complejo TOR y las mitocondrias, donde la vía TOR puede regular positiva o negativamente la función de las mitocondrias y controlar los niveles de ATP. Al respecto, observamos que los mutantes *raptor1b*, *rps6b* y *lst8-1* muestran niveles aumentados de proteína CYTc en hojas de roseta (**Figura 22C**), lo cual se condice con un estudio proteómico global realizado por Montes et al. (2022). También sabemos que los niveles de CYTc juegan un papel relevante en la coordinación del crecimiento de las plantas, ya que tanto la falta como la sobreexpresión de CYTc afectan significativamente la tasa de crecimiento de las plantas y la producción de biomasa (Racca et al., 2018; Welchen & Gonzalez, 2016). Sin embargo, no pudimos revertir el fenotipo de crecimiento de los mutantes *raptor1b* y *rps6b* aumentando la expresión de CYTc (**Figura 23**), lo que demuestra que se requiere una vía TOR activa para el efecto positivo de CYTc sobre el crecimiento de las plantas. Por otro lado, la sobreexpresión de TOR fue capaz de restaurar el crecimiento y suprimir otras características relacionadas con la baja actividad de TOR en plantas con deficiencia de CYTc, pero no fue capaz de restaurar el potencial de membrana mitocondrial ni los niveles de ATP, ubicando a TOR aguas abajo de CYTc y de la actividad mitocondrial.

En conjunto, nuestros resultados indican que el crecimiento reducido de las plantas con deficiencia en CYTc se debe a la activación de una señal de alarma preventiva de "hambreado o inanición" que altera la actividad de la vía TOR. Nuestra interpretación es que se desencadena una señal de "alarma" preventiva para reducir el crecimiento como forma de anticiparse a la escasez de energía. Sería interesante indagar si este escenario es similar en otras mutantes con deficiencias en la actividad mitocondrial (Gras et al., 2020; Kühn et al., 2015; Welchen et al., 2014) para determinar qué procesos mitocondriales específicos están conectados con la activación de TOR (**Figura 31**).

También proponemos que la alteración del crecimiento y otros procesos como la autofagia provocada por la deficiencia de CYTc a través de cambios en la actividad de

la vía TOR debe considerarse como una respuesta retrógrada que conecta la función mitocondrial con el resto de la célula. Si bien la naturaleza de la señal involucrada en este caso no es evidente, lo más probable es que esté relacionada con la producción de energía por parte de las mitocondrias. Una explicación sencilla sería que el ATP influye directamente en la actividad de la quinasa TOR dado que es un sustrato de la misma, tal como se propone para TOR de humanos (Dennis et al., 2001). La eficiencia de este mecanismo dependerá de las concentraciones intracelulares de ATP y de la afinidad ( $K_m$ ) de TOR por su sustrato. Si bien se propuso que los niveles de ATP en el citoplasma de las células de la raíz de *A. thaliana* son de aproximadamente 0,75 mM (Voon et al., 2018), se desconocen los parámetros cinéticos de TOR de plantas. Como referencia, la mayoría de los estudios con TOR de mamíferos informaron valores de  $K_m$  de aproximadamente 0,1 mM (Nicastro et al., 2023; Tao et al., 2010; Toral-Barza et al., 2005), con la excepción de Dennis et al. (2001), quienes informaron un valor de 1 mM. Sería interesante determinar los parámetros cinéticos de TOR de plantas para evaluar si los cambios en los niveles de ATP pueden afectar directamente su actividad. Sin embargo, también se debe considerar la presencia de inhibidores competitivos internos que aumentarían la  $K_m$  aparente *in vivo*, como se describió para TOR de levaduras y mamíferos (Nicastro et al., 2021, 2023). En este sentido, varios inhibidores competitivos de TOR-ATP comúnmente utilizados, como el AZD, inhiben eficazmente los procesos dependientes de TOR, lo que sugiere que no está funcionando en condiciones saturantes de ATP en plantas.



**Figura 31.** Las señales que comunican la mitocondria con la vía TOR. **(A)** En condiciones normales de crecimiento, las mitocondrias utilizan moléculas específicas como azúcares y aminoácidos, como fuente de energía, para producir finalmente ATP a través de la cadena de transporte de electrones mediada por CYTc. El ATP y/u otras señales desconocidas relacionadas con la función mitocondrial (?) activan la vía TOR y los procesos corriente abajo (inhibición de la autofagia, fosforilación de S6K, fosforilación de RPS6, traducción), promoviendo así el crecimiento. Los aminoácidos derivados de la autofagia (BCAA) pueden regular la vía TOR y pueden servir como fuente de electrones para la mitocondria (e-) (Cao et al., 2019; O’Leary et al., 2019). Alternativamente (flecha discontinua), la vía respiratoria mitocondrial mediada por CYTc también puede modular los niveles de S6K, ya sea directa o indirectamente a través de TOR. Por el contrario, TOR puede regular positiva o negativamente la función mitocondrial, manteniendo los niveles de ATP y afectando el metabolismo del carbono (Cunningham et al., 2007; Dai et al., 2022; O’Leary et al., 2019; Ramanathan & Schreiber, 2009). **(B)** La reducción en los niveles de CYTc afecta los niveles de ATP y la actividad TOR, lo que lleva a una disminución significativa de los niveles de S6K, P-S6K y P-RPS6, resultando en una fuerte disminución del crecimiento. Además, la actividad mitocondrial alterada debido a la deficiencia de CYTc activa una señal de alarma de "inanición" que provoca un aumento de los niveles de autofagia y aminoácidos libres, conduciendo a una mejor adaptación a las condiciones de deficiencia de carbono. **Líneas negras**, vía activa; **líneas grises**, vía inhibida; **líneas llenas**, evidencia demostrada o reportada previamente; **líneas discontinuas**, hipótesis propuestas. **Abreviaturas:**

BCAA, aminoácidos de cadena ramificada; e-, electrones; ?, señales desconocidas; P, fosforilación.

Además de TOR, se deben considerar posibles alteraciones en otras vías de señalización relacionadas con condiciones energéticas, como la vía SnRK1 (Margalha et al., 2019), la cual a su vez está estrechamente conectada con la vía TOR (Artins et al., 2023; Jamsheer et al., 2022). Por otro lado, la autofagia constituye un proceso central regulado positivamente por SnRK1, permitiendo que las plantas se adapten mejor a entornos estresantes. En línea con esto, recientemente se ha demostrado que la señalización de SnRK1, y por tanto la autofagia, puede ser regulada por proteínas localizadas en las mitocondrias, mejorando así la tolerancia y supervivencia de las plantas al estrés nutricional (Schmitt & Van Aken, 2023; C. Yang et al., 2023). También sería interesante analizar si la degradación de las mitocondrias a través de la mitofagia, que se activa principalmente en situaciones de estrés nutricional (Broda et al., 2018; Kacprzak & Van Aken, 2022), se activa basalmente en las plantas mutantes *cytc-1*. De esta manera podríamos comprender mejor los mecanismos moleculares involucrados durante el ajuste del crecimiento, el metabolismo y las respuestas al estrés, ante cambios en la actividad mitocondrial.

En resumen, planteamos la hipótesis de que una disfunción mitocondrial afecta la producción de energía, y esto genera cambios en la actividad TOR, que le permiten a la planta ajustar el crecimiento y el metabolismo para adaptarse a la nueva condición. Por otra parte, disfunciones más graves que bloquean el transporte de electrones y provocan un aumento en los niveles de ROS se traducen a través de la vía ANAC017 para hacer frente a esta situación estresante. También sería interesante analizar posibles conexiones entre ambas vías para comprender mejor cómo la actividad mitocondrial se conecta con el resto de la célula, afectando así el crecimiento y las respuestas al estrés.

***Capítulo 2: Estudio del efecto de la sobreexpresión de CYTc-1 en plantas de interés agronómico.***

## **8. Introducción**

Para asegurar la vida, los alimentos deben proporcionar un suministro adecuado de calorías y nutrientes. La inseguridad alimentaria y la falta de acceso a un suministro alimenticio adecuado amenazan a millones de personas en todo el mundo. El problema empeora cuando se tienen en cuenta las proyecciones de la población mundial, la cual se espera que alcance los 8.3 mil millones para 2030 (Naciones Unidas, Departamento de Asuntos Económicos y Sociales, División de Población, 2017). Como resultado, la demanda de alimentos, la alimentación animal y el combustible aumentarán (Sundström et al., 2014). A este panorama se le han sumado nuevas amenazas como el aumento de los factores que provocan estrese de tipo abióticos como consecuencia del cambio climático, la disminución de tierras cultivables debido a la desertificación, salinización y las consecuencias del mal uso humano; además de las enfermedades emergentes y las pérdidas económicas que esto provoca. Para mejorar la seguridad alimentaria para las generaciones futuras, el mundo debe duplicar la tasa actual de producción de cultivos a pesar de las amenazas previstas, incluido el cambio climático (Godfray et al., 2010; Jones et al., 2014). Los mejoradores de plantas han aprovechado mutaciones naturales y artificiales, así como tácticas importantes como la cría para obtener vigor híbrido, para abordar la inseguridad alimentaria. Sin embargo, se requerirá trabajo adicional para enfrentar los desafíos actuales y emergentes.

Para mejorar el rendimiento de los cultivos, los enfoques actuales buscan aumentar la cantidad de alimentos producidos por unidad de área cultivada y generar cultivos más tolerantes o resistentes. Por un lado, para incrementar el rendimiento por área en cultivos de granos como el arroz, los mejoradores se han enfocado en aumentar el número de granos producidos por planta, el número de plantas que se pueden cultivar por unidad de área y el tamaño de cada grano. Muchos de estos rasgos implican la manipulación de la arquitectura de la planta mediante el equilibrio de la actividad del meristema y la señalización hormonal. Por otro lado, para prevenir pérdidas en los cultivos y mejorar el rendimiento, los mejoradores han centrado su atención en mejorar la tolerancia distintos tipos de estrés, como calor, frío, luz intensa, salinidad, presencia de metales pesado, entre otros. Además, equilibrar los requisitos energéticos para la resistencia y el crecimiento para minimizar las penalizaciones en el rendimiento sigue siendo un tópico de arduo trabajo por parte de los mejoradores y científicos, aun sin solución.

## 8.1 Crecimiento y desarrollo del maíz (*Zea mays*)

Los híbridos de maíz modernos tienen poca semejanza con el ancestro más lejano del maíz, el teocinte. El maíz es una planta hermafrodita, lo que significa que produce flores masculinas y femeninas separadas en la misma planta. La panoja (flor masculina) produce polen, mientras que la mazorca (flor femenina) produce los óvulos que se convierten en la semilla. Un híbrido de maíz se produce cuando el polen de una línea endogámica se usa para polinizar los estigmas de otra línea endogámica. Una vez que ocurre esto, se produce la heterosis, o vigor híbrido, y las plantas producidas a partir de las semillas híbridas suelen ser más resistentes y con características mejoradas, lo que incluye un mayor rendimiento del grano. La producción de semillas híbridas depende del uso de las líneas endogámicas, las cuales se desarrollan mediante la autopolinización de estigmas por el polen producido en la misma planta. Este proceso se repite a lo largo de varias generaciones, hasta que la línea endogámica se considera genéticamente pura (Endicott et al., 2015).

Al determinar las etapas de desarrollo del maíz, es importante saber que se usa más de un sistema para describir el desarrollo. A lo largo de este trabajo usaremos el sistema desarrollado en la Universidad del Estado de Iowa, que divide el desarrollo del maíz en etapas vegetativas (V) y reproductivas (R) (**Figura 32**). El uso de este sistema marca etapas fisiológicas definidas en el desarrollo de la planta facilitando su diferenciación.

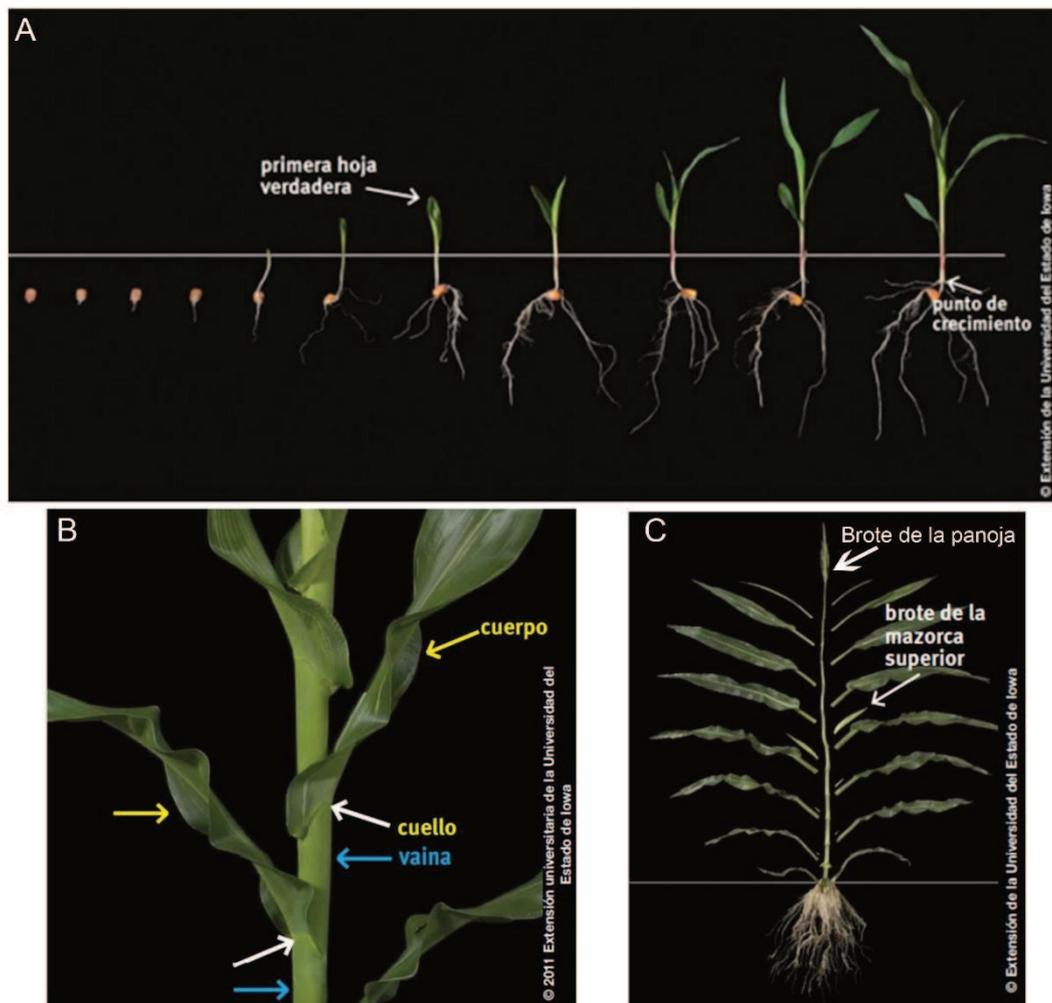
Etapas vegetativas (V)		Etapas reproductivas (R)	
VE	Emergencia	R1	Aparición de los estigmas
V1	Primera hoja	R2	Blíster
V2	Segunda hoja	R3	Grano lechoso
V3	Tercera hoja	R4	Grano pastoso
V(n)	Enésima hoja	R5	Grano dentado
VT	Aparición de las panojas	R6	Grano maduro

**Figura 32. Etapas vegetativas y reproductivas de la planta de maíz.** Imagen modificada de Endicott et al. (2015).

### 8.1.1 Etapas vegetativas

En la **Figura 33A** se muestran las distintas etapas vegetativas (V) de la planta de maíz, que comienzan con la emergencia de la raíz (VE). Luego comienza la aparición de la primera hoja verdadera (V1), y continúan numerándose de forma sucesiva con la aparición de cada hoja, hasta que emerge la panoja (VT, **Figura 33C**).

La hoja de maíz tiene tres partes principales: el cuerpo, la vaina y el cuello (**Figura 33B**). El cuerpo es la parte plana de la hoja que intercepta la luz solar; la vaina es la parte que se envuelve alrededor del tallo; y el cuello es la línea de demarcación entre el cuerpo y la vaina, normalmente con una curva definida. A medida que la planta de maíz crece, cada hoja sucesiva sale a la luz debido a la elongación del tallo y a la expansión de la hoja en secuencia desde la semilla hasta la panoja. La punta de la hoja es la primera parte visible; luego le sigue el cuerpo de la hoja, y finalmente el cuello y la vaina. Cuando un cuello es visible, la hoja se considera completamente emergida y se cuenta en el esquema de etapas (Endicott et al., 2015).



**Figura 33. Diferentes estadios de desarrollo de una planta de maíz. (A)** Desarrollo de una plántula de maíz desde la germinación hasta el estadio V2. **(B)** Planta de maíz que muestra hojas completamente emergidas, con los cuellos de hoja visibles. **(C)** Vista de la disección de una planta VT, en transición hacia la etapa reproductiva. En esta etapa, la panoja puede ser visible fuera del verticilo. Imágenes modificadas de Endicott et al. (2015).

### 8.1.2 Etapas reproductivas

Se determinaron seis etapas reproductivas (ver **Figura 32**). La primera de ellas (R1) comienza cuando emergen los estigmas de la mazorca (flor femenina). Los estigmas emergen durante un período de tres a cinco días, comenzando por los estigmas adheridos en la parte media baja de la mazorca y avanzando hacia la punta de la mazorca. Según el ambiente, un estigma continúa creciendo durante aproximadamente siete días o hasta que intercepta los granos de polen. El desprendimiento de polen se produce de forma discontinua durante un período de aproximadamente cinco a ocho días, y solo sucede cuando las condiciones de temperatura y humedad son favorables. Inmediatamente después de la fertilización, el óvulo crea una capa de abscisión en la base del estigma que impide la entrada de material genético de otros granos de polen. El estigma luego se desprende del grano en desarrollo, comienza a desecarse y se vuelve de color marrón. El conjunto de granos (granos crecimiento activamente después de la polinización) puede examinarse dos o tres días después de que termina el desprendimiento del polen al quitar cuidadosamente las chalas de una mazorca y, luego, al sacudir suavemente la mazorca para ver si los estigmas están desprendidos. Los estigmas desprenden los óvulos que han sido fertilizado exitosamente (granos), pero cualquier óvulo que conserve un estigma no ha sido fertilizado y no se desarrollará ningún grano. Luego de la fertilización, el óvulo va a experimentar diferentes procesos hasta convertirse en un grano, pasando por diferentes etapas (**Figura 34**) dependiendo de su color, forma, humedad y contenido de almidón (Endicott et al., 2015).



**Figura 34. Esquemas de los órganos reproductivos del maíz. (A)** Panoja de maíz completamente emergida (flor masculina). **(B)** Mazorca de maíz inmadura (flor femenina) que muestra estigmas emergentes. **(C)** Separación vertical entre las flores masculina y femenina en una planta de maíz. Imágenes adaptadas de Endicott et al. (2015).

## 8.2 La importancia del Nitrógeno (N) para el crecimiento del maíz

El aumento de la producción mundial de maíz en el último medio siglo ha sido posible gracias al uso extensivo de fertilizantes nitrogenados. El N es el nutriente más limitante para la producción de granos de maíz en todo el mundo (Mueller et al., 2014). La aplicación correcta de fertilización con N es crucial dado el impacto negativo de la fertilización excesiva de N (Sela et al., 2018).

En el paradigma de la intensificación sostenible, existe la necesidad de aumentar concomitantemente la producción de granos y la eficiencia del uso de N, ya que existen preocupaciones con respecto a los impactos negativos del excesivo uso de fertilizantes (Cassman et al., 2002). Por lo tanto, el aumento de la tolerancia de las plantas a condiciones de bajo N mejoraría la producción de maíz, especialmente en regiones con bajos niveles de este nutriente.

Los niveles de N influyen la fisiología y el desarrollo de las plantas de maíz. Por un lado, determinan el tamaño de la hoja y su capacidad fotosintética (Vos et al., 2005), y en consecuencia afectan el rendimiento del grano de maíz (Muchow & Davis, 1988). Se ha visto que una deficiencia de N reduce significativamente la capacidad fotosintética y por ende el área de las hojas (Boussadia et al., 2010), y además acelera el proceso de senescencia foliar (Massignam et al., 2012). Por su parte, el grado de fotosíntesis durante el llenado del grano puede verse afectado por otros factores, incluida la variedad

de maíz, la condición climática, el CO<sub>2</sub>, la temperatura, así como el nivel de N disponible en el suelo (Jaaffar & Gardner, 1988).

El N también juega un papel central en la producción de proteínas vegetales. Por lo tanto, la deficiencia de N conduce a cambios en los niveles de expresión de las proteínas, así como en los niveles de actividad de las enzimas, lo que inevitablemente conduce a cambios en el metabolismo de las plantas (Wei et al., 2015).

### **8.3 Etapa de desarrollo y crecimiento del arroz (*Oryza sativa*)**

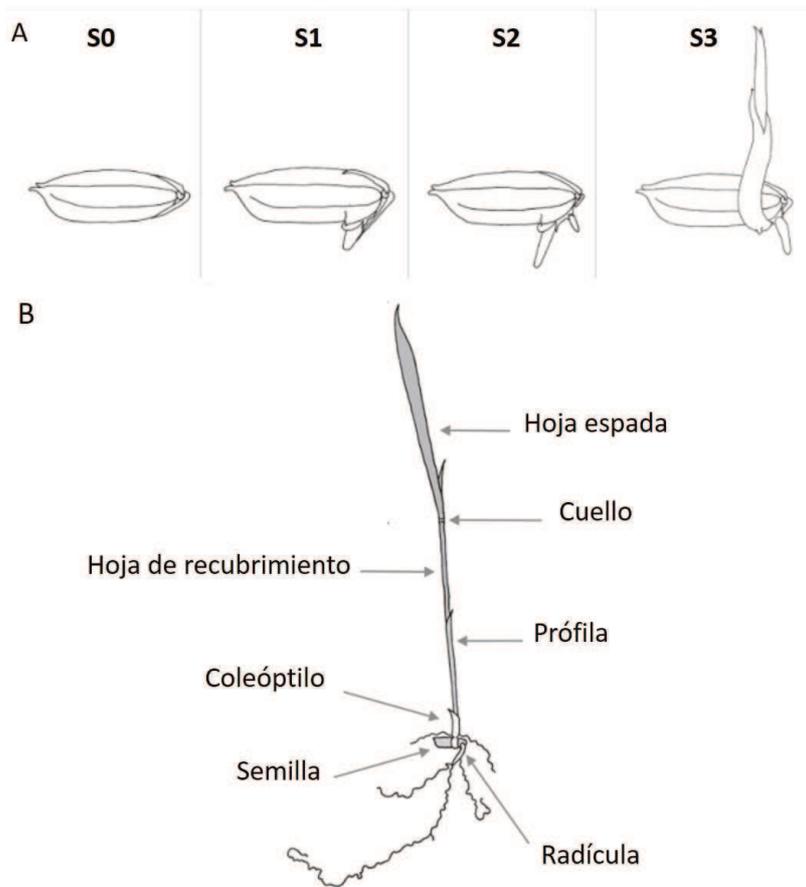
El arroz es uno de los cultivos alimenticios más importante del mundo y proporciona el alimento básico para la mitad de la población mundial. En los últimos años, con el rápido crecimiento de la población, el cambio climático y el aumento de la contaminación del suelo, el área de siembra efectiva de los cultivos ha ido disminuyendo año tras año. Por lo tanto, aumentar la producción de arroz se ha convertido en un aspecto importante para garantizar la seguridad alimentaria.

El arroz es una gramínea anual con tallos redondos, huecos y articulados; láminas foliares estrechas, planas y sésiles unidas a las vainas foliares con cuello; aurículas pilosas bien definidas, en forma de hoz; pequeñas lígulas agudas a acuminadas o dos hendidas y panículas terminales.

El desarrollo morfológico del arroz se puede dividir en tres fases: plántula, vegetativa y reproductiva (Counce et al., 2000).

#### **8.3.1 Etapa de plántula**

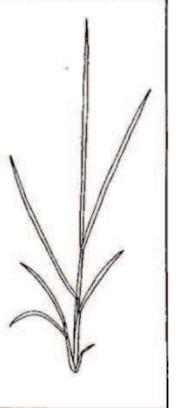
La secuencia de eventos de desarrollo de plántulas que ocurren normalmente consta de cuatro etapas de crecimiento (**Figura 35**): semilla seca (S<sub>0</sub>), emergencia de radícula y coleóptilo de la semilla (S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>) y emergencia de la prófila a través del coleóptilo (S<sub>3</sub>). La prófila es la primera hoja en emerger, pero carece de lámina y collar y consta únicamente de la vaina de la hoja.



**Figura 35. Representación de los primeros estadios de desarrollo de la planta de arroz. (A)** Estadios de la plántula de arroz S0, S1, S2 y S3. **(B)** Partes de la planta de arroz en estadio V1. Imagen adaptada de Counce et al. (2000).

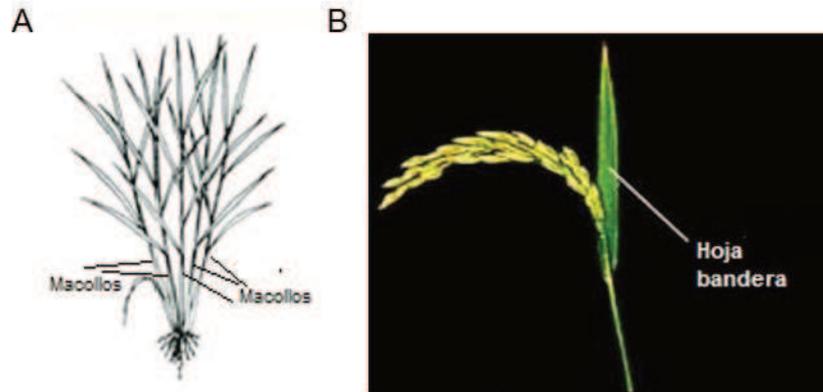
### 8.3.2 Etapa vegetativa

El desarrollo vegetativo consta de etapas  $V_1$ ,  $V_2$ , hasta  $V_N$  (**Figura 36**); siendo N igual al número final de hojas con cuello (línea de demarcación entre el cuerpo y la vaina) en el tallo principal. A cada hoja le sucede una hoja adicional hasta la formación de la hoja final en un culm, la hoja bandera (**Figura 37B**). Etapas tardías del desarrollo vegetativo ( $V_{F-4} - V_F$ ) y la etapa temprana del desarrollo reproductivo ( $R_0 - R_2$ ) ocurren simultáneamente.

Etapa de crecimiento	V1	V2	V3	V4	V5
Marcador morfológico	Formación del cuello en la primera hoja completa (Hoja 1) sobre el tallo principal	Formación del cuello en la hoja 2 sobre el tallo principal	Formación del cuello en la hoja 3 sobre el tallo principal	Formación del cuello en la hoja 4 sobre el tallo principal	Formación del cuello en la hoja 5 sobre el tallo principal
Imagen					

**Figura 36. Etapas de crecimiento vegetativo de plantas de arroz hasta estadio V5.** Imagen adaptada de Counce et al. (2000).

Los macollos son brotes secundarios que dan lugar a la formación de tallos desde el pie vegetal (**Figura 37**).



**Figura 37. Representación de estadio reproductivo del arroz. (A)** Representación de los macollos en una planta de arroz. **(B)** Representación de la hoja bandera en una planta de arroz.

### 8.3.3 Etapa reproductiva

El desarrollo reproductivo consta de 10 etapas de crecimiento basadas en criterios morfológicos discretos: iniciación de la panícula (R0), diferenciación de la panícula (R1), formación del cuello de la hoja bandera (R2), salida de la panícula (R3), antesis (R4), expansión de la longitud y ancho del grano (R5), expansión de la profundidad del grano

(R6), secado del grano (R7), madurez de cada grano (R8) y madurez completa de la panícula (R9).

Las condiciones de crecimiento cada vez más inhóspitas a las que deben adaptarse las plantas como consecuencia del fenómeno de cambio climático, las obliga a crecer en suelos desfavorables y bajo condiciones de temperaturas extremas. Por otro lado, el aumento de la tasa de crecimiento mundial y la consecuente demanda en la producción de alimentos, nos obliga a tomar un compromiso como ciudadanos dedicados a las soluciones agrobiotecnológicas.

Frente a este escenario, la generación de cultivos resistentes a estreses ambientales, con valor nutricional agregado, biomasa aumentada y mayores niveles de producción por área cultivada, constituyen focos de trabajo claves que deben ser atacados por la Agrobiotecnología.

En este contexto e impulsados por los resultados previos del laboratorio (Racca et al., 2018) que demuestran el efecto del CYTc en el crecimiento de *A. thaliana*, nos propusimos obtener plantas de interés agronómico, como arroz y maíz, con altos niveles de CYTc, para evaluar funciones conservadas de esta hemoproteína en dichas especies.

## 9. Objetivos

- i. Analizar el impacto de incrementar los niveles de CYTc en plantas de arroz y maíz.

Dado los trabajos previos del laboratorio, en donde se demostró el efecto positivo del CYTc en el crecimiento de *A. thaliana*, nos propusimos obtener líneas de arroz y maíz con elevados niveles de CYTc. Sabemos que estos cultivos son preponderantes en nuestra zona y son de gran interés agronómico a nivel mundial. Es por esto que nos planteamos como objetivo evaluar posibles funciones conservadas del CYTc en distintas especies, analizando el crecimiento en diferentes condiciones nutricionales.

## 10. Materiales y Métodos

### 10.1 Construcciones utilizadas para transformar plantas de maíz

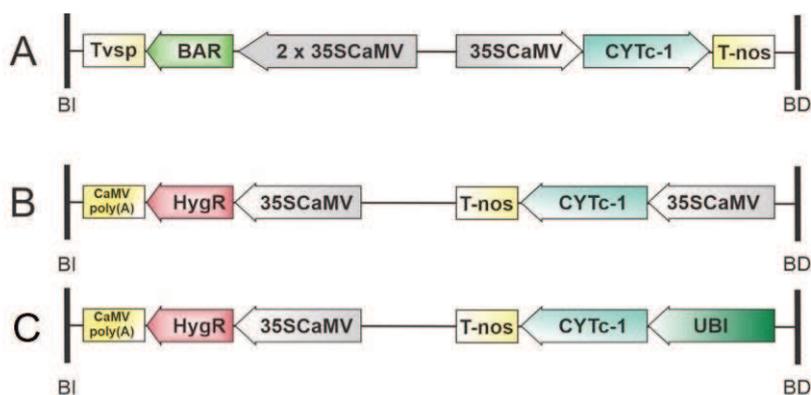
Se utilizaron plantas de maíz de la variedad B73, transformadas por personal de la Unidad de proyectos institucionales (UPI) del Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (IAL-CONICET-UNL).

La expresión del gen *CYTc-1* se dirigió bajo el control del promotor constitutivo fuerte del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV). La construcción *35S::CYTc-1* se clonó en dos vectores de expresión diferentes: pTF101.1 (Frame y col. 2002) y pIAL (diseñado en el IAL, no publicado). Un fragmento de 527 pb conteniendo la región codificante completa, más una porción del 3-UTR del gen *CYTc-1* de *A. thaliana* (At1g22840), fue amplificado con oligonucleótidos específicos y clonado en el vector Binario pBI-121 bajo el control del promotor 35SCaMV (Jefferson y col., 1987) (Construcción 1). Posteriormente, el fragmento completo que contenía el promotor constitutivo fuerte 35SCaMV dirigiendo la expresión de la porción de interés para expresar la proteína AtCYTc-1 y el terminador *NOS* (**Figura 38A**), fue digerido desde el vector pBI-121 en los sitios *HindIII* y *EcoRI* y clonado de manera independiente en los vectores binarios pTF101.1 y pIAL. Ambos vectores contienen los elementos necesarios que acompañan al fragmento de interés, para asegurar una transformación estable y exitosa de las plantas de maíz. En los dos casos, el marcador de selección de la presencia del T-DNA conteniendo el gen de interés es el gen *BAR*. El gen *BAR* es proveniente de una cepa de *Streptomyces hygroscopicus*, y codifica para la enzima PAT (*Phosphinothricin acetyltransferase*), que le confiere a las plantas la resistencia al herbicida glufosinato de amonio (BASTA).

### 10.2 Construcciones para transformar plantas de arroz

Para la transformación de plantas de arroz se utilizó la variedad Kitakee. El vector utilizado fue el pCambia1380 (Hajdukiewicz et al., 1997). La transformación con este vector les confiere a las plantas de arroz la resistencia al antibiótico Higromicina (*Hygromycin B*). Se trata de un aminoglicósido que inhibe la síntesis proteica. Para el armado de la construcción *35S::CYTc-1*, el fragmento *EcoRI/HindIII* (mencionado en la sección anterior, construcción 1) fue clonado directamente en los mismos sitios en el vector pCambia1380 (**Figura 38B**).

Para la construcción *UBI::CYTc*, se utilizó el promotor de la Ubiquitina 1 de maíz. Con este objetivo, a partir de la construcción 1 descrita en el párrafo anterior, se reemplazó el promotor constitutivo fuerte *35SCaMV*, por un fragmento de 1405 pb correspondiente al promotor de Ubiquitina 1 (UBI) de maíz (**Figura 38C**). El fragmento completo contenido en esta construcción se clonó en los sitios *EcoRI/HindIII* del vector pCambia1380.



**Figura 38. Esquema de las construcciones utilizadas para transformar plantas de arroz y maíz. (A)** Construcción *35S::CYTc-1* para maíz. **(B)** Construcción *35S::CYTc-1* para arroz. **(C)** Construcción *UBI::CYTc* para arroz.

### 10.3 Cultivo de plantas de maíz

#### 10.3.1 Experimento en condiciones variables de N

Las semillas de maíz se esterilizaron 1 minuto con etanol 70%, seguido de 3 lavados con agua destilada estéril y 15 minutos de incubación con una solución de lavandina al 50% + Tween 20 0,1%. Finalmente se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril. Las semillas se colocaron en placas de Petri estériles con algodón y servilletas de papel y se dejaron germinar en oscuridad por tres días. Luego se las puso en luz hasta que el coleóptilo alcanzó los 4 cm (aproximadamente dos días). Posteriormente se removió el endosperma y se traspasaron a una plancha de goma eva con agujeros en donde se insertaron las plántulas. Las plantas se ubicaron separadas a una distancia equidistante de 6cm y se colocaron en una bandeja cuadrada de (35x35x10 cm) con 5 L de solución nutritiva. Esta solución contenía 0.75 mM  $K_2SO_4$ , 0.25 mM  $KH_2PO_4$ , 0.1 mM KCl, 0.65

mM MgSO<sub>4</sub>, 0.13 mM EDTA-Fe, 1.0 μM ZnSO<sub>4</sub>, 1.0 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.0 μM MnSO<sub>4</sub>, 0.1 μM CuSO<sub>4</sub>, and 0.005 μM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.

Los experimentos de hidroponia se llevaron a cabo en una cámara de crecimiento artificial con una densidad de flujo de fotones de 200 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, con un ciclo de 16 hs de luz y 8 hs de oscuridad y una temperatura controlada de 28°C. A la solución nutritiva de crecimiento se le agregó 2.0 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, en forma de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, hasta que las plántulas expandieron una hoja. Luego se comenzó con el estrés por nitrógeno y la muestra se dividió a la mitad suponiendo una distribución mendeliana en donde una bandeja se la trató con la solución nutritiva y 40 μM de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (bajo nitrógeno) y la otra con 4.0 mM de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (alto nitrógeno) (Gao et al., 2015). La concentración de Ca<sup>2+</sup> en el tratamiento de bajo N fue ajustada al mismo nivel que alto N por la adición de CaCl<sub>2</sub>. La solución nutritiva se renovó cada 3 días y las bandejas se colocaron al azar y se cambiaron de posición con frecuencia. Para la selección de las plantas transgénicas, se pintó un fragmento de la hoja 1 totalmente expandida con una solución del herbicida glufosinato de amonio (BASTA® o Liberty®).

### **10.3.2 Medición de parámetros morfológicos**

#### **10.3.2.1 Largo de raíz**

Las semillas de maíz se sembraron directamente en tierra en un dispositivo de crecimiento vertical formado por paneles de vidrio donde las raíces podían alcanzar una profundidad de 40 cm. A los 7 días post-germinación se pintó la hoja 1 con una solución de BASTA para seleccionar las plantas transgénicas. Las plantas fueron regadas y fertilizadas una vez a la semana con Hakaphos® Rojo. Este ensayo fue llevado a cabo en el invernadero del Instituto con un ciclo de 16h luz/8 h oscuridad, con una temperatura de entre 10°C a 40°C entre los meses de septiembre y noviembre. Para la medida de longitud de raíz en los diferentes tratamientos se utilizó el software Fiji. En todos los casos, el criterio utilizado fue el mismo, tomando desde el punto de crecimiento (**Figura 33A**) y siguiendo hasta el final de la raíz más larga.

#### **10.3.2.2 Largo del tallo**

Para la medida de largo de tallo se utilizó regla graduada y se fijó desde el punto de crecimiento hasta el cuello de la última hoja expandida.

### 10.3.2.3 Peso tejido seco

Para la medida de peso de tejido seco se diseccionaron las plantas entre tejido aéreo y radicular a la altura del punto de crecimiento, se dejó secar en estufa a 60 °C por tres días y luego de eso se realizó la pesada en balanza analítica. Para el cálculo del tejido total se realizó la suma de tejido radicular más tejido aéreo.

### 10.3.2.4 Partición materia seca

Para la medida de partición de materia seca se utilizaron los datos de peso de tejido seco y se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Partición de materia radicular} = \frac{\text{Peso seco T. radicular}}{\text{Peso seco T. radicular} + \text{Peso seco T. aéreo}} * 100$$

$$\text{Partición de materia aérea} = \frac{\text{Peso seco T. aéreo}}{\text{Peso seco T. radicular} + \text{Peso seco T. aéreo}} * 100$$

### 10.3.2.5 Cantidad de hojas expandidas

Para contar la cantidad de hojas expandidas se tomó como base la definición de “hoja expandida”, por lo que solamente se tomaron en consideración aquellas hojas que tenían un cuello perfectamente marcado (**Figura 33B**).

### 10.3.2.6 Diámetro del tallo

Para la medida de diámetro del tallo se usó un calibre digital. Por tratarse de un tallo en forma de elipse estas medidas se dividieron en dos: diámetro mayor y menor, teniendo en cuenta los ejes de la elipse. Todas las medidas fueron tomadas a 3.5 cm del punto de crecimiento.

### 10.3.2.7 Parámetros fotosintéticos

Las medidas de parámetros fotosintéticos fueron tomadas a los 10 y 13 días luego de iniciado el tratamiento. Para ello se utilizó el equipo IRGA (del inglés *Infra Red Gas Analysis*) marca Li-COR modelo 6400XT (**Figura 39**). En todos los casos se usó la segunda hoja de la planta. El dispositivo se empleó según las especificaciones del fabricante, siempre respetando el sentido adaxial - abaxial y usando la misma altura de la hoja para todas las medidas.



**Figura 39.** IRGA (del inglés *Infra Red Gas Analysis*) marca Li-COR modelo 6400XT.

#### 10.4 Cultivo de plantas de arroz

Las semillas de arroz se extrajeron de sus vainas y se les hizo un tratamiento térmico a 50°C durante 5 días. Pasado ese tiempo se incubaron durante 1 minuto con etanol 70%, seguido de 3 lavados con agua destilada. Posteriormente se incubaron durante 15 minutos en una solución de lavandina al 50% Tween 20 0,1%. En flujo laminar se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril, se dejaron secar en servilleta estéril y luego se colocaron en placas de Petri estériles. Las mismas contenían medio MS 0.5X, agar al 0.8% (p/v) e higromicina 50 mg/L, y se cultivaron en cámara a 28°C, con un fotoperiodo de día largo (16 h luz/8 h oscuridad). Luego de la selección por antibiótico, aquellas que sobrevivieron se pasaron a macetas de 0.5 L, con sustrato adecuado y agregado de Basacote® (50 g cada 40 L de tierra) para continuar con su crecimiento en cámara de cultivo a 29°C con una intensidad de luz de  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , hasta un estadio V5. Luego fueron trasplantadas a macetas de 1 L e inundadas en bandejas de (35x35x10 cm) donde se colocaron 5 macetas por bandeja con una solución de Hakaphos® Rojo y 0.5 g de hierro quelatado por L de solución. Luego se colocaron en invernadero con una temperatura de entre 10°C a 40°C, entre los meses de agosto y diciembre. En todos los casos el ciclo de luz/oscuridad fue de 16 hs/8 hs.

#### 10.4.1 Altura de las plantas

Para la medida de altura de la planta de arroz se utilizó una cinta métrica. La misma fue tomada desde la base de la planta hasta la hoja bandera más alta. La hoja bandera es la que antecede a la panoja (**Figura 37**).

#### 10.4.2 Medida de la producción

Para la medida de producción se dejaron secar las plantas hasta el final de su ciclo y se cosecharon los macollos reproductivos. Luego se pesaron en balanza analítica las espigas.

#### 10.4.3 Determinaciones de respiración

Para el consumo de oxígeno, se utilizaron hojas banderas de plantas de arroz. Estas fueron cortadas e incubadas en oscuridad y buffer de medición [fosfato de potasio 10 mM (pH 7.2), KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 25 mM] por al menos 20 minutos. Luego se transfirieron a la cámara de medición con 2 ml del mismo buffer. Las mediciones fueron realizadas a 25°C usando un electrodo de oxígeno del tipo Clark (Hansatech, Norfolk, UK) (**Figura 40**). La capacidad de la vía COX fue determinada como el consumo de O<sub>2</sub> sensible al agregado de KCN (10mM). La capacidad de la vía alternativa o AOX, fue determinada como el consumo de O<sub>2</sub> sensible a la presencia de ácido salicilhidroxámico (SHAM) (10 mM). Las medidas fueron realizadas de acuerdo a lo descrito por Welchen y col. (2012) (Welchen et al., 2012).



**Figura 40.** Electrodo de oxígeno del tipo Clark (Hansatech, Norfolk, UK).

## 10.5 Análisis de la expresión de proteínas

### 10.5.1 Extracción de proteínas totales

Para el análisis mediante *Western Blot*, se utilizaron extractos de proteínas totales. Para ello, 100 mg de material vegetal fueron pulverizados en nitrógeno líquido e incubados con 300 µl un buffer de extracción (Tris-HCl 125 mM pH 8.8, SDS 1% (p/v), glicerol 10% (v/v), Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 50 mM, PMSF 0.2 mM e inhibidor de proteasas 1X (cOmplete™ Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche). Se realizó una incubación durante 10 minutos, en hielo, agitando para favorecer la extracción. Se centrifugó a 12000 rpm, 10 minutos, a 4°C. Se recuperó el sobrenadante, al que se le adicionó 1/10 del volumen de buffer de siembra (Tris-HCl 125 mM pH 6.9, SDS 12% (p/v), glicerol 15 % (v/v), β-mercaptoetanol 22% (v/v) y azul de bromofenol 0.001 % (p/v)).

### 10.5.2 Separación electroforética (SDS-PAGE) y *Western Blot*

Los extractos se incubaron a 37°C por 15 minutos y luego se sembraron en un gel de poliacrilamida al 16 % conteniendo Tricina, para ser separados mediante una corrida electroforética en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), según el protocolo establecido por Schägger, 2006 (Schägger, 2006). Las proteínas fueron posteriormente electrotransferidas durante 1 hora a 100 V a una membrana de PVDF (*Hybond-ECL*, *GE-Healthcare*®), previamente activada con metanol, utilizando el buffer de transferencia correspondiente (25 mM Tris, 190 mM glicina, pH 8.3, 20 % metanol (v/v)). Una vez finalizada la transferencia, las membranas se bloquearon durante 1 hora en leche 5 % (p/v) en solución TBS-Tween 0.1% (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20). En esta misma solución se diluyó el anticuerpo primario específico para la proteína CYTc (Agrisera, dilución 1/3000), ACTINA (Agrisera, dilución 1/10000) y GAPC (dilución 1/10000) y fueron incubados con la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente. El exceso de anticuerpo no unido a las proteínas se eliminó mediante un lavado de 5 minutos con solución TBS-Tween 0.1%. Se agregó el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (Agrisera) conjugado con la enzima peroxidasa (1/50000). Después de incubar 1 hora a temperatura ambiente, se realizaron cuatro lavados de 10 min con TBS-Tween 0.1%. La detección de la peroxidasa se realizó según el protocolo de revelado recomendado por el fabricante usando reactivos quimioluminiscentes.

## 11. Resultados

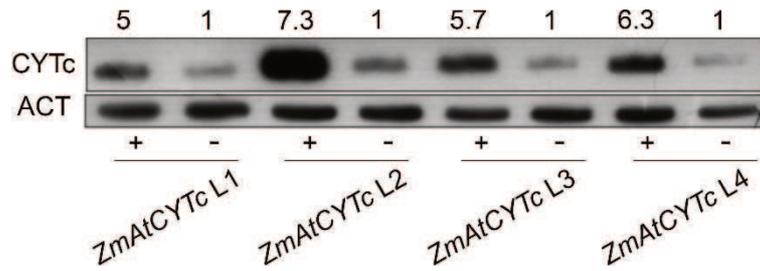
### 11.1 Caracterización de líneas de maíz sobreexpresantes de CYTc-1 (ZmAtCYTc)

#### 11.1.1 Análisis de la expresión de CYTc

En el laboratorio contábamos con plantas de maíz transformadas con la construcción 35S::CYTc-1, que permite expresar de manera constitutiva elevados niveles de la proteína CYTc-1 de *A. thaliana* (AtCYTc). Análisis previos habían confirmado la presencia del transgén de interés (AtCYTc-1) en las líneas en estudio mediante reacción de PCR con oligonucleótidos específicos, por lo que continuamos con el análisis de los niveles de proteína CYTc, mediante *Western Blot*.

Evaluamos 4 líneas ZmAtCYTc provenientes de eventos de transformación independientes, las que llamamos arbitrariamente L1 a L4. De ellas se extrajeron proteínas totales a partir de hoja para realizar el análisis por *Western Blot*. Cada una de las líneas transgénicas contaba con su respectiva línea segregante nula (-), que corresponde a aquella planta que atravesó todos los pasos de la transformación, pero no incorporó el transgén.

Como se puede ver en la **Figura 41**, las 4 líneas ZmAtCYTc presentaron entre 5 y 7 veces más CYTc, en comparación con su respectiva línea segregante nula, utilizada como control. Cabe destacar que, si bien el anticuerpo está diseñado contra la proteína CYTc de *A. thaliana*, no podemos descartar que haya, además, reconocimiento de la proteína endógena de maíz. Esto ha sido reportado previamente por el proveedor del anticuerpo (AGRISERA®), por lo que la banda observada en las segregantes nulas (señaladas en la figura como “-“) corresponde a los niveles endógenos de CYTc de maíz, a los que le otorgamos un valor de “1” para efectuar la semi-cuantificación realizada con el software Fiji, a partir de la imagen obtenida luego de revelar el experimento de *Western Blot*.



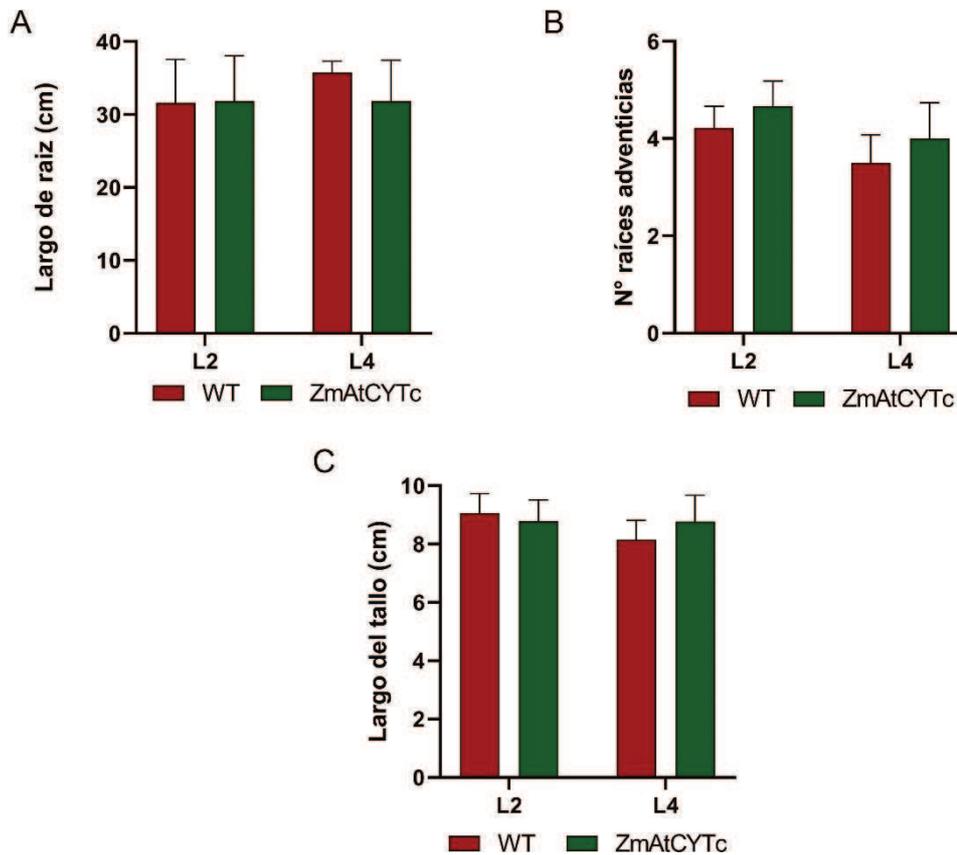
**Figura 41. Análisis por Western Blot de las líneas sobreexpresantes de maíz ZmAtCYTc.**

Los números en la parte superior indican la cantidad de veces que se expresa la proteína CYTc con respecto a su WT. De izquierda a derecha se presentan las líneas 1 a 4, donde el “+” indica las líneas que presentan la construcción y el “-” representa las líneas WT o segregantes nulas de cada línea. Se utilizó anti-CYTc y anti-actina como normalizador.

De esta manera confirmamos que las líneas ZmAtCYTc expresan elevados niveles de CYTc, y que las 4 líneas presentan niveles similares entre sí. Para los estudios fenotípicos posteriores continuamos trabajando con las líneas L2 y L4.

### 11.1.2 Análisis fenotípico en condiciones normales de crecimiento

Analizamos el crecimiento de plantas crecidas en tierra, de las líneas ZmAtCYTc L2 y L4 en un estadio V2, con sus correspondientes controles WT. Evaluamos la longitud de la raíz, el número de raíces adventicias y el largo del tallo (**Figura 42A, B y C**), y no observamos diferencias significativas en ninguno de estos parámetros. Esto indica que, en un corto período de crecimiento y en condiciones de nutrición óptimas, no habría crecimiento diferencial entre las líneas ZmAtCYTc y WT.

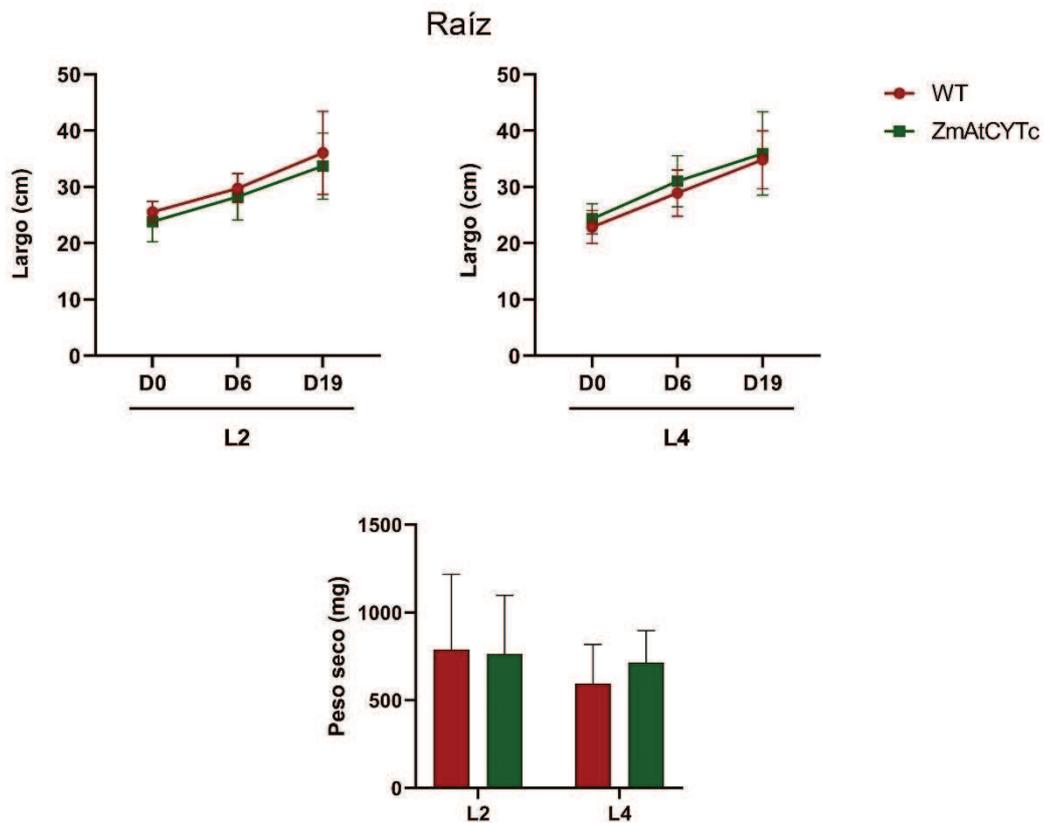


**Figura 42. Medidas de parámetros fenotípicos de plantas ZmAtCYTc en condiciones control.** En plantas ZmAtCYTc L2 y L4, en estadio V2, se evaluó largo de raíz principal (A), número de raíces adventicias (B) y largo del tallo (desde la base hasta la última hoja expandida) (C).

### 11.1.3 Crecimiento en hidroponia o condiciones de cultivo líquido

Posteriormente evaluamos los parámetros fenotípicos de longitud de raíz, largo y diámetro del tallo, peso seco y cantidad de hojas expandidas, en condiciones de hidroponia.

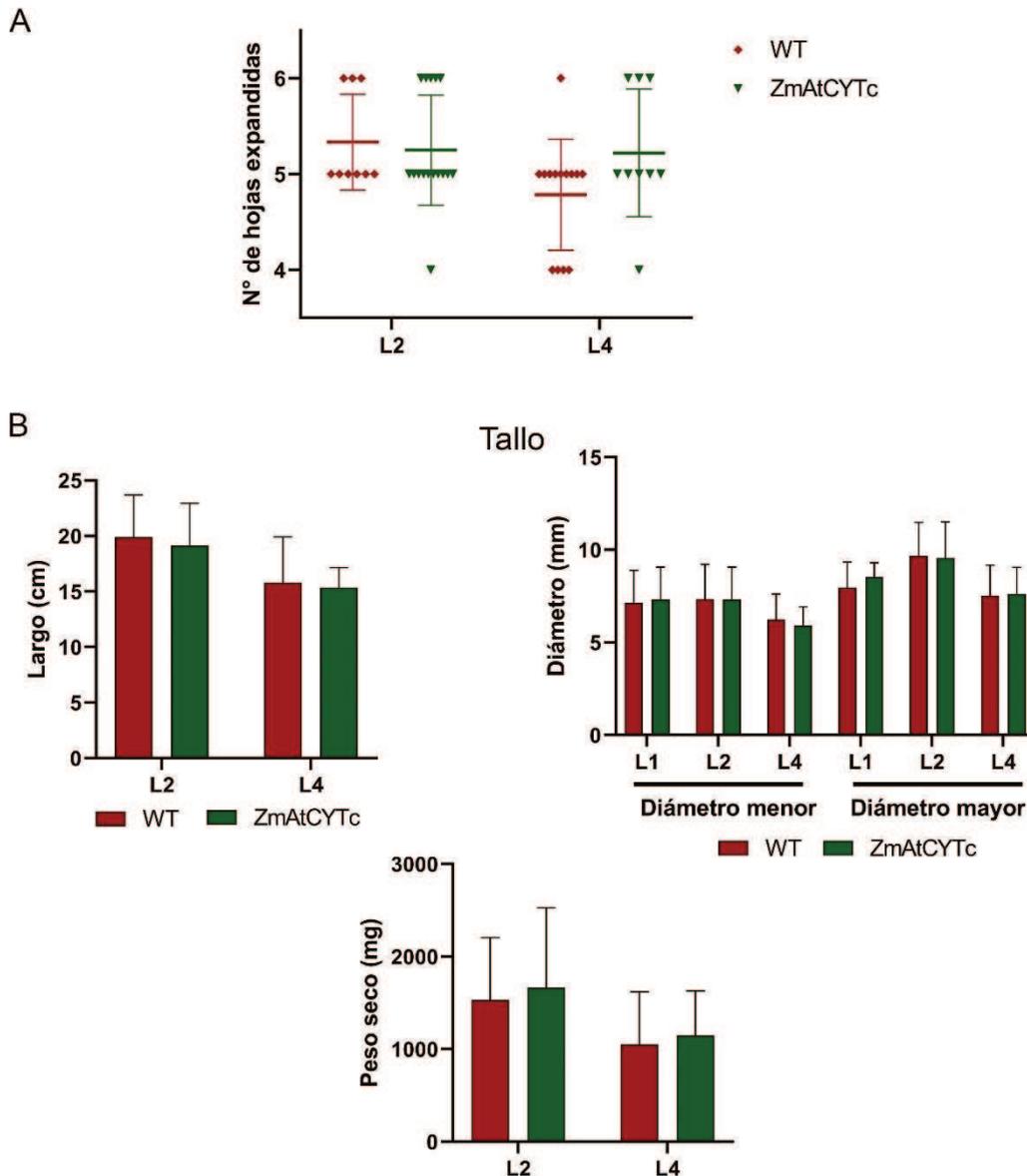
Para el largo de raíz (**Figura 43, superior**) no se observan diferencias significativas entre las líneas sobreexpresantes ZmAtCYTc y el control WT. Tampoco se observaron diferencias significativas en biomasa seca de raíz entre las líneas (**Figura 43, inferior**).



**Figura 43. Longitud de raíz y biomasa seca de líneas ZmAtCYTc crecidas en hidroponia.**

En el panel superior se muestra el largo de raíz de las líneas L2 y L4, evaluadas en condiciones normales de nitrógeno con medidas progresivas desde el día 0 al día 19. El día 0 corresponde a 12 días después de la siembra, de plantas crecidas en hidroponia en condiciones normales de nitrógeno (2mM). En el panel inferior se muestra la biomasa seca del tejido radicular de estas líneas.

Luego evaluamos el largo y diámetro del tallo, así como su biomasa seca, en plantas en estadio V5-V6 (**Figura 44A**). Con respecto al largo del tallo (**Figura 44B, panel izquierdo**), no observamos diferencias significativas con el control WT. Lo mismo sucede con el diámetro mayor y menor del tallo (**Figura 44B, panel derecho**), donde ninguna de las líneas ZmAtCYTc presentó diferencias respecto a su control WT. Respecto a la biomasa seca de este tejido, podemos ver que es igual entre cada la línea ZmAtCYTc y su segregante nula (**Figura 44B, panel inferior**).



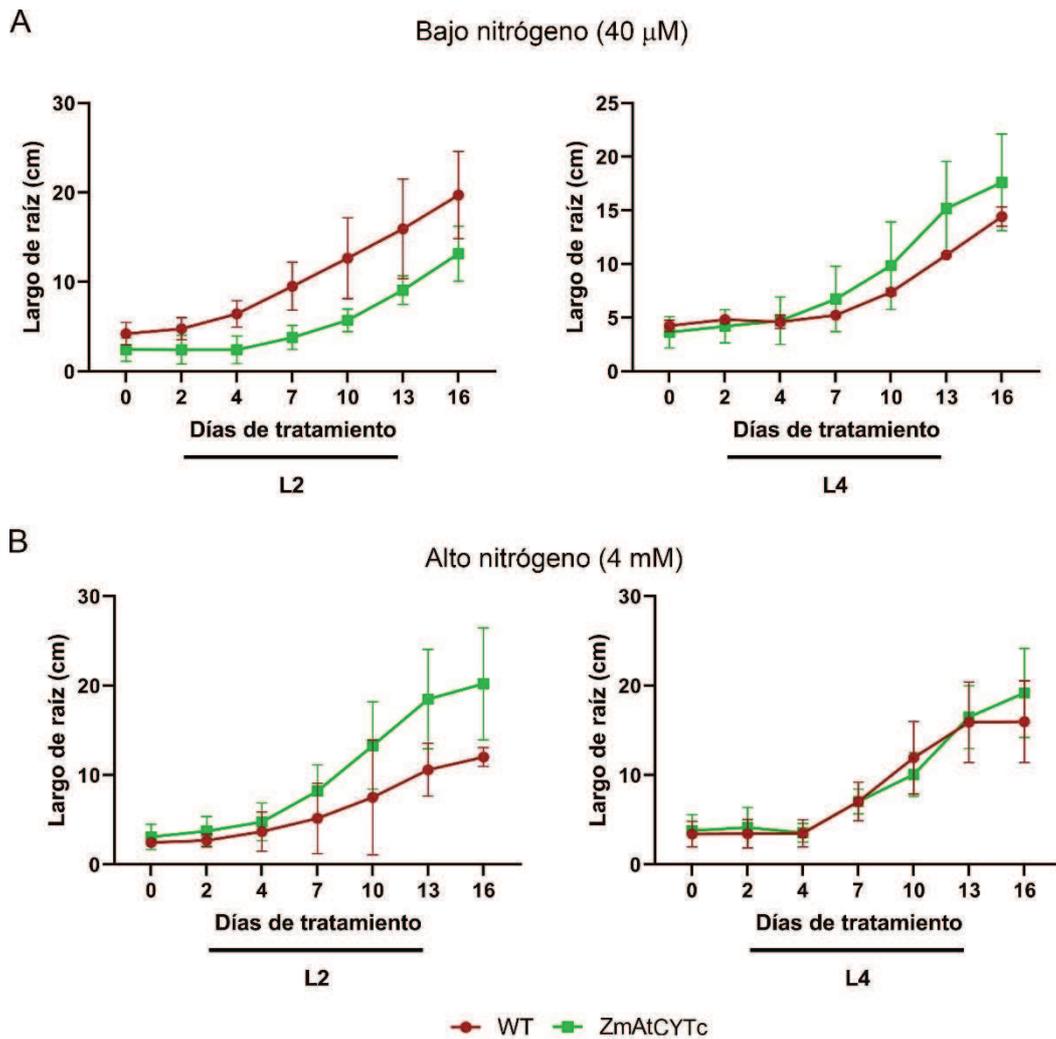
**Figura 44. Medidas fenotípicas del tallo en líneas ZmAtCYTc. (A)** Cantidad de hojas expandidas al momento de realizar la cuantificación. **(B)** Largo de tallo (desde la base hasta la última hoja expandida), diámetro mayor y menor y biomasa seca de la parte aérea de las líneas evaluadas.

### 11.1.3.1 Crecimiento en condiciones variables de nitrógeno

Sabemos que el uso de fertilizantes nitrogenados aumenta el costo de la producción y agrava la contaminación ambiental, por lo que una agricultura sostenible requiere de cultivos con alta eficiencia en el uso de N. Para conocer el comportamiento de nuestras líneas frente al uso de nitrógeno, las enfrentamos a diferentes concentraciones del mismo y evaluamos parámetros como el largo de la raíz principal y la partición de la materia seca entre parte aérea y radicular.

Para llevar adelante este experimento nos basamos en la evidencia presentada por Gao y col., (2015) (Gao et al., 2015). Así, se tomó 40  $\mu\text{M}$  como condición de bajo nitrógeno (BN), y 4 mM como alto nitrógeno (AN) (ambos provistos por el anión ( $\text{NO}_3^-$ )). El diseño experimental implicó el crecimiento de las plantas de maíz en hidroponía en distintos regímenes de N, por un total de 16 días desde el momento en que las plantas expandieron su primera hoja.

Para el largo de raíz en condiciones de BN (**Figura 45A, izquierda**) observamos que la raíz principal de la línea WT es más larga que la de la línea ZmAtCYTc L2, pero esa diferencia se observa desde el principio del tratamiento por lo que no corresponde a una condición diferencial de crecimiento por nitrógeno. Para el caso de la línea L4 el crecimiento es muy similar para los dos genotipos, durante todo el tratamiento (**Figura 45A, derecha**).

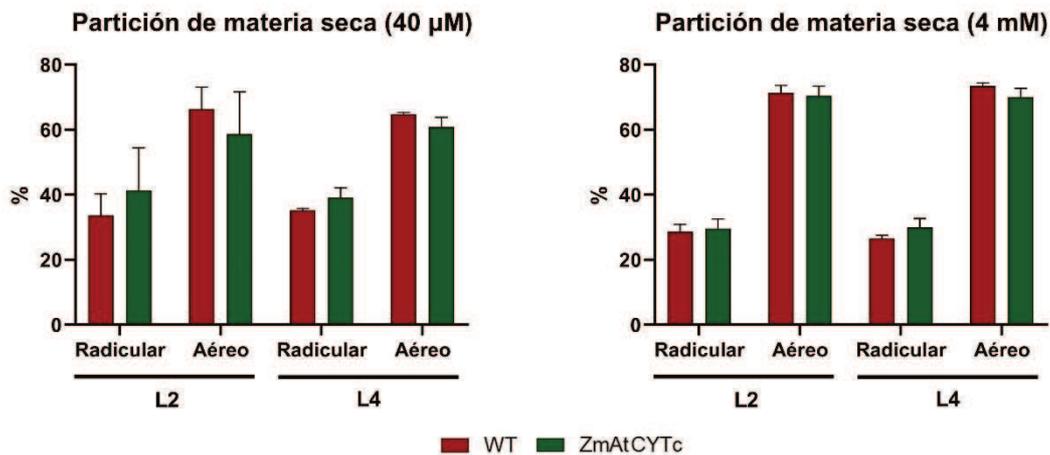


**Figura 45. Longitud de raíz en condiciones de BN y AN. (A)** Largo de raíz de líneas L2 y L4, desde el inicio del tratamiento hasta los 16 días, expuestas a  $40 \mu\text{M}$  (BN). **(B)** Largo de raíz de las mismas líneas expuestas a 4 mM (AN).

Con respecto al tratamiento en AN (**Figura 45B**), observamos que la línea L2 comienza con una longitud de raíz similar al control WT, pero que luego del día 4 comienza a superar la longitud de la línea WT, manteniendo esta diferencia hasta el final del tratamiento. Respecto a la línea L4, vemos que el largo de la raíz principal es similar al control WT.

Si analizamos la partición de materia seca en ambas condiciones observamos que no hay diferencias significativas entre las líneas sobreexpresantes ZmAtCYTc y las segregantes nulas (**Figura 46**). Al efectuar un análisis respecto de la diferencia que se observa en los tratamientos, vemos que en condición de BN hay un mayor crecimiento

radicular a expensas del crecimiento aéreo, mientras que en AN la proporción aérea es mucho mayor a la radicular.

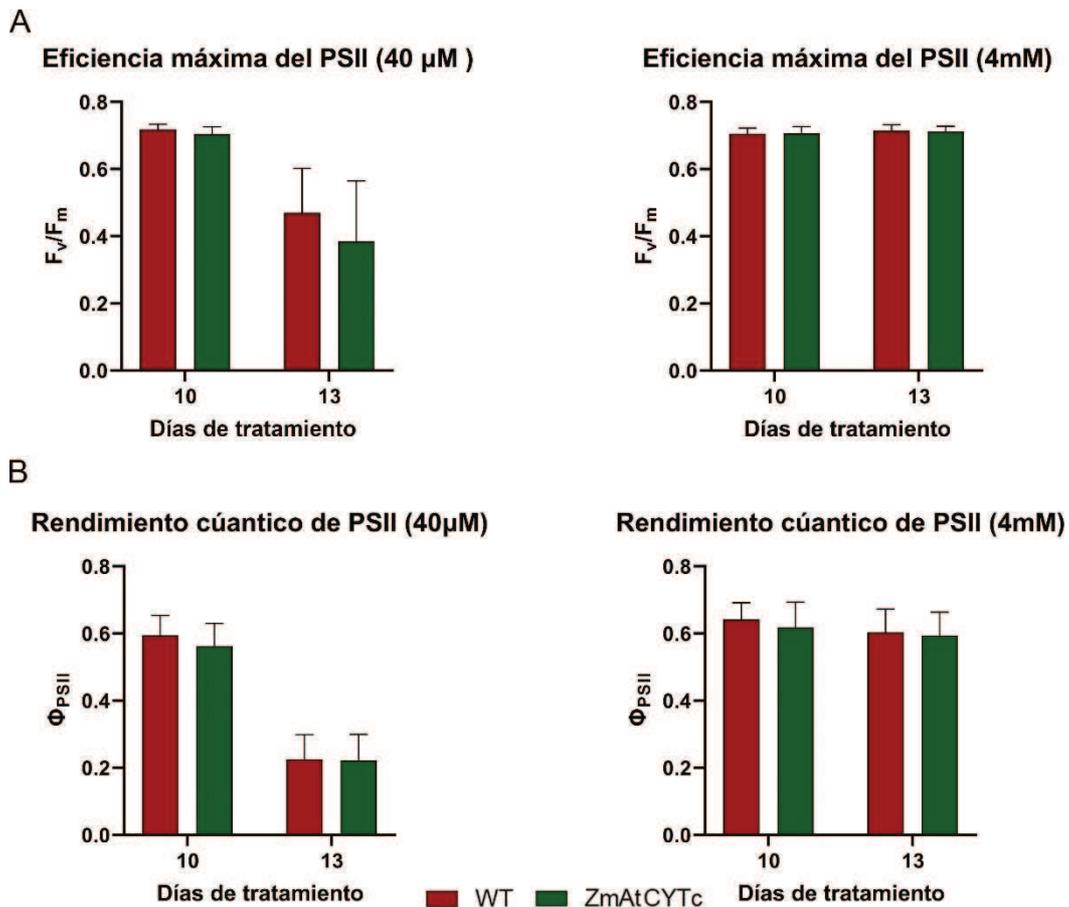


**Figura 46. Partición de materia seca en líneas ZmAtCYTc.** Se representa la proporción de biomasa seca entre parte aérea y radicular, en condición de BN (izquierda) y AN (derecha).

#### 11.1.4 Análisis de la fluorescencia de la clorofila

La energía lumínica absorbida por las moléculas de clorofila puede (i) impulsar la fotosíntesis (fotoquímica); (ii) volver a emitirse como calor; o (iii) volver a emitirse como luz (fluorescencia). Estos tres procesos no existen de forma aislada, sino que compiten entre sí por utilizar la energía lumínica. Por lo tanto, el rendimiento de la emisión de fluorescencia de clorofila nos brinda información valiosa sobre la eficiencia cuántica de la fotoquímica y la disipación de calor. Esto es importante para la fotosíntesis de las plantas y, en última instancia, la productividad, ya que la energía fotoquímica se utiliza para proporcionar energía y poder reductor para la asimilación de CO<sub>2</sub> y la consecuente producción de biomasa.

Continuando con la caracterización de las plantas ZmAtCYTc, se realizaron medidas de fluorescencia de la clorofila utilizando el equipo IRGA (*Infra Red Gas Analysis*), a los 10 y 13 días de exposición al tratamiento con distintas concentraciones de nitrógeno. Las medidas se realizaron tomando la hoja V2 en cada una de las plantas. Se evaluaron los parámetros de eficiencia máxima del fotosistema II (PSII) (expresado como  $F_v/F_m$ , **Figura 47A**) y el rendimiento cuántico del PSII ( $\Phi_{PSII}$ , **Figura 47B**).



**Figura 47. Parámetros fotosintéticos en líneas ZmAtCYTc.** (A) Eficiencia máxima del PSII ( $F_v/F_m$ ) en condiciones de BN (izquierda) y AN (derecha). (B) Rendimiento cuántico del PSII representado por  $\Phi_{PSII}$ , de líneas crecidas en condiciones BN (izquierda) y en condiciones de AN (derecha).

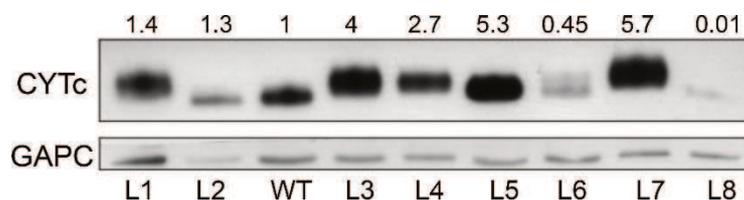
Como se puede ver en la **Figura 47**, los resultados de ambos parámetros fotosintéticos no arrojaron diferencias significativas entre las líneas sobreexpresantes ZmAtCYTc y sus correspondientes segregantes WT, en ninguna de las condiciones de N evaluadas. En todos los casos los parámetros se mantuvieron dentro de los valores normales y no se observó una alteración en el PSII en los días en los que se realizaron las mediciones. Con respecto al crecimiento en condiciones BN, se observa que en el día 13 de tratamiento, los parámetros fotosintéticos presentan valores menores que al día 10 en ambas líneas, lo que podría indicar que las plantas comenzaron a afectarse por el bajo aporte de nitrógeno en el medio de crecimiento.

## 11.2 Caracterización de líneas de arroz sobreexpresantes de CYTc-1 (OsAtCYTc)

### 11.2.1 Análisis de los niveles de sobreexpresión de CYTc

La Unidad de Proyectos Institucionales (UPI, <https://ial.conicet.gov.ar/la-unidad/>) del IAL obtuvo líneas de arroz transformado con la construcción *35S::CYTc-1* (utilizada para transformar plantas de maíz, descrito anteriormente), así como también con una construcción para expresar el CYTc-1 bajo el promotor de Ubiquitina 1 de maíz (*UBI::CYTc-1*). Tomamos estas líneas independientes y analizamos mediante *Western Blot* los niveles de proteína CYTc para poder determinar con qué plantas modificadas genéticamente continuar trabajando.

Como se puede ver en la **Figura 48**, las líneas transgénicas L3, L4, L5 y L7 presentaron mayores niveles de CYTc, respecto al control salvaje o WT, por lo que continuamos los análisis con estas líneas. Cabe aclarar que las líneas que se muestran en esta figura corresponden a las obtenidas con la construcción *UBI::CYTc-1*, ya que no hemos obtenido ninguna línea sobreexpresante con el promotor constitutivo 35S, por lo que se descartaron para continuar con el análisis.



**Figura 48. Análisis de los niveles de proteína CYTc en líneas OsAtCYTc.** Se analizaron por *Western Blot* las diferentes líneas (OsAtCYTc L1-L8). Los números en la parte superior corresponden a la cantidad de veces que se expresa la proteína CYTc con respecto al control WT. Se utilizó anti-CYTc y anti-GAPC (gliceraldehído-3-P deshidrogenasa) como normalizador.

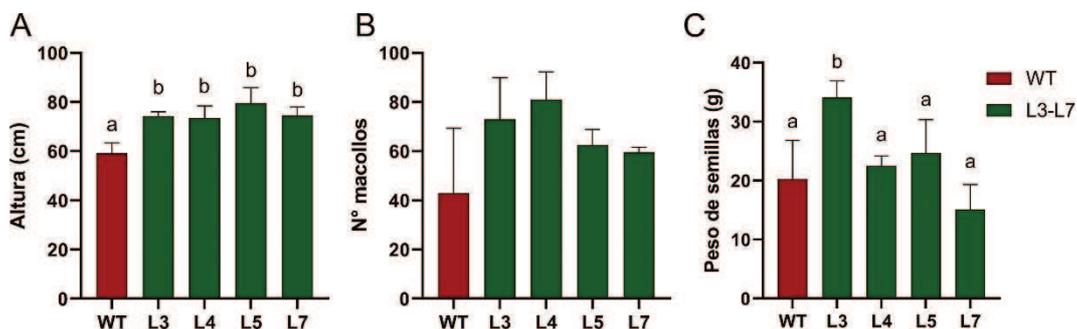
### 11.2.2 Análisis fenotípico

Analizamos parámetros como altura de la planta, número de macollos y producción de granos, como medidas de crecimiento y rendimiento de las líneas en estudio. Las mediciones de altura y cantidad de macollos se realizaron entre la etapa reproductiva R7 y R8 de las plantas de arroz, que se corresponde al día 140 después de la siembra, en plantas crecidas en invernadero de bioseguridad. Cabe aclarar que el número exacto de días para realizar este análisis puede variar, y depende del ciclo de crecimiento

(horas de luz, cantidad/calidad de luz y temperatura) en el que se estén evaluado las plantas.

En cuanto a la altura de las plantas (**Figura 49A**), observamos que las líneas OsAtCYTc poseen una altura mayor respecto a la línea WT. Luego analizamos el número de macollos (**Figura 49B**), donde observamos una gran variabilidad entre plantas del mismo genotipo, particularmente en la línea WT. Esto no nos permitió demostrar diferencias significativas estadísticamente, pero sí una tendencia al alza de las líneas OsAtCYTc, en comparación al control WT.

Por último, evaluamos la producción (**Figura 49C**), como el peso total de las semillas producidas por planta. De las líneas analizadas sólo una de ellas, la línea L3, evidenció una mayor producción respecto a la línea WT. Además, podemos observar que la cantidad de macollos no se correlacionó de manera directa con una mayor producción. Esto puede deberse a que no todos los macollos fueron productivos o llenaron sus vainas.



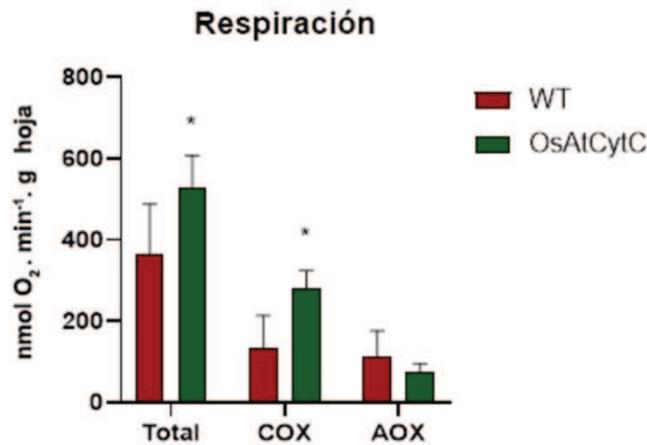
**Figura 49. Medida de parámetros de crecimiento y producción en líneas OsAtCYTc. (A)** Altura de las plantas, medida desde la base hasta la hoja bandera más alta. **(B)** Número de macollos por planta. **(C)** Producción de granos por planta. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ;  $n > 6$ ).

### 11.2.3 Medidas de respiración

En paralelo al análisis fenotípico de las distintas líneas de arroz, evaluamos la tasa de respiración de las mismas, con el objetivo de determinar si los elevados niveles de proteína CYTc tendrían algún impacto en la actividad respiratoria mitocondrial. Utilizamos la hoja bandera de plantas en estadio R7 para hacer la determinación de la tasa de respiración. En la **Figura 50** se muestran los resultados obtenidos agrupados

como una única línea OsAtCYTc, ya que se contaba con un bajo número de réplicas por línea. Previo a esto corroboramos que las líneas presentaban valores comparables.

Al analizar los resultados de la **Figura 50**, vemos que la tasa de respiración total es significativamente superior en las plantas sobreexpresantes OsAtCYTc, comparada con la de las plantas WT. Si analizamos el aporte que hace cada vía respiratoria a la respiración total, vemos que la vía COX dependiente de CYTc, es la que se encuentra significativamente aumentada. La vía alternativa (dependiente de la Oxidasa Alternativa, AOX) se encuentra ligeramente disminuida. Esto nos sugiere que la sobreexpresión de CYTc estaría afectando positivamente la tasa de respiración total, a través del aporte a la vía COX, que es la productora de energía en forma de ATP. Esto podría explicar, en parte, la mayor producción de semillas observada.



**Figura 50. Tasa de respiración total, vía COX y AOX.** Medidas de respiración total, mediada por la vía COX, y mediada por la oxidasa alternativa (AOX), en línea OsAtCYTc y WT. Los asteriscos representan diferencias significativas entre la línea WT y OsAtCYTc para cada condición, según la prueba T *Student* no pareada ( $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ).

## 12. Discusión de Resultados

El incremento en la demanda de alimentos esperado para 2050, deberá ir acompañado de un aumento en las tasas de rendimiento de los principales cultivos productores de granos (trigo, maíz, arroz y soja) (González et al., 2020). Este incremento puede darse por varios motivos que tienen que, ver en parte, con el cambio climático que hará que aumenten las temperaturas y la frecuencia de eventos extremos como la sequía e inundaciones (Pachauri et al., 2014). Además, debido a las precipitaciones limitadas y a la elevada demanda de evapotranspiración, el estrés salino se ha convertido en otra grave amenaza para la producción de cultivos (Flowers & Yeo, 1995; Munns, 2002).

Además, los sistemas alimentarios actuales contribuyen significativamente al calentamiento global y son responsables del 19-29 % de las emisiones globales, la mayor parte de las cuales provienen directamente de las actividades de producción agrícola (Vermeulen et al., 2012). En este sentido, existe la necesidad de aumentar concomitantemente la producción de granos y la eficiencia del uso de recursos como el N, ya que existen preocupaciones con respecto a los impactos negativos del excesivo uso de fertilizantes nitrogenados (Cassman et al., 2002, 2003).

Estas demandas representan singulares desafíos para la agrobiotecnología, y es aquí donde la biotecnología moderna comienza a jugar un rol muy importante utilizando la modificación genética para lograr la adaptación de los cultivos a entornos desfavorables. Por estos motivos, y basándonos en las evidencias previas reportadas por nuestro grupo de trabajo que describen que plantas de *A. thaliana* con elevados niveles de CYTc poseen un crecimiento adelantado y una mayor producción (Racca et al., 2018), nos propusimos evaluar el fenotipo de plantas de arroz y maíz con niveles aumentados de AtCYTc.

En primer lugar, identificamos líneas para ambos cultivos, positivas para el transgén de interés *AtCYTc-1*, y luego continuamos con su análisis. Mediante *Western Blot* identificamos 3 líneas de maíz (**Figura 41**) y 4 líneas de arroz (**Figura 48**), con elevados niveles de CYTc. Para el caso de las líneas de arroz, se obtuvieron plantas transformadas con las construcciones *35S::CYTc-1* y *UBI::CYTc-1*, pero se comprobó que el mejor sistema de expresión es utilizando el promotor de *Ubiquitina 1*, ya que permitió obtener líneas con altos niveles de la proteína CYTc, mientras que no ocurrió lo mismo para la construcción *35S::CYTc-1* (Park et al., 2010).

En cuanto a las **plantas de maíz**, evaluamos los parámetros de crecimiento frente a diferentes concentraciones de N. Lamentablemente, no observamos ninguna diferencia significativa a nivel fenotípico en estas plantas, en las condiciones de N ensayadas, por lo que CYTc no estaría otorgando ninguna ventaja adicional respecto de las plantas salvajes frente a estas condiciones, al menos en los estadios evaluados.

Resulta interesante remarcar que, de acuerdo a nuestra hipótesis original de trabajo, todas nuestras condiciones experimentales incluyeron situaciones “deficitarias” de aporte de N, en una búsqueda por evaluar si los mayores niveles de CYTc-1 podrían eficientizar reacciones metabólicas para hacer un uso más eficiente del N disponible en el medio. Y esto conduciría a una disminución del uso de compuestos nitrogenados en el ambiente, con su consecuente impacto beneficioso.

Sin embargo, quizás nuestro razonamiento debió ser el inverso. En estudios posteriores al desarrollo de los experimentos realizados para esta capítulo de la tesis, se demostró que las plantas con niveles aumentados de la vía regulada por la quinasa TOR, eran capaces de producir mayor biomasa y producción vegetativa, a medida que se incrementaba el aporte de N en el suelo (Lutt & Brunkard, 2022). Si tenemos en cuenta la conexión entre la vía respiratoria dependiente del CYTc y la vía regulada por la quinasa TOR desarrollada en el capítulo 1 de esta tesis, podríamos pensar que las plantas sobreexpresantes de CYTc, podrían tener una vía TOR más activa y, por ende, requerir un mayor aporte nutricional de N para mostrar sus características fenotípicas beneficiosas frente a las plantas salvajes. Experimentos programados a futuro, permitirán desentrañar esta nueva hipótesis de trabajo.

Por otro lado, cabe destacar que utilizamos la condición de crecimiento de hidroponía a fin de poder analizar el crecimiento radicular. Sin embargo, esto podría adicionar variables que desconocemos y que afecten el experimento y al crecimiento de las plantas. Es por esto que no descartamos probar adicionar distintas cantidades de fertilizante de nitrógeno en distintos sustratos como arena, perlita o arena (Chun et al., n.d.; Findenegg, 1990; Gaudin et al., 2011), entre otros.

En cuanto al crecimiento radicular en condiciones normales tampoco observamos diferencias, por lo que se podría probar en plazos más largos de crecimiento. Sería interesante probar un ciclo completo del cultivo para hacer un análisis de producción.

Respecto a las **plantas de arroz**, pudimos analizar el crecimiento y algunos parámetros fenotípicos a lo largo de todo el ciclo de vida de la planta. Encontramos que las líneas OsAtCYTc analizadas presentan una mayor biomasa, con tendencia a tener mayor

número de macollos, y en sólo una de ellas se determinó una mayor producción (**Figura 49**).

Estos datos, si bien no son concluyentes, nos dan un indicio de que la producción podría ser un parámetro extrapolable de *A. thaliana* a arroz. Además, en estas plantas se observó una mayor tasa de respiración (vía COX, dependiente de CYTc) (**Figura 50**). Esto podría implicar una mayor producción de ATP lo que explicaría el mayor crecimiento de las plantas.

Bien sabemos que hemos trabajado con variedades transformadas que no son las comerciales. Entonces observar diferencias o propiedades de resistencia a estrés abiótico o crecimiento normal, podría no reproducirse en variedades comerciales. En ese caso las características fenotípicas podrían ayudarnos a caracterizar las funciones del CYTc, más allá de su aplicación agrobiotecnológica.

### 13. Conclusiones generales

A lo largo del presente trabajo de tesis, evaluamos el impacto de alterar los niveles del transportador de electrones mitocondrial CYTc, en plantas de *A. thaliana*, arroz y maíz.

En el **capítulo 1** describimos el fenotipo de crecimiento que presentan las mutantes *cytc-1* y mediante el uso de distintas herramientas caracterizamos parámetros moleculares, relacionados con la mitocondria y el metabolismo en plantas.

Los resultados obtenidos aportaron evidencias de gran relevancia que demuestran la conexión entre la respiración mitocondrial a través del CYTc y la vía TOR. Una falla energética causada por una deficiencia en CYTc, impacta en la activación de la vía TOR, disminuyendo los niveles tanto de P-S6K como P-RPS6, así como los niveles de proteína S6K, debido a una degradación aumentada de la misma. Como consecuencia, se genera un incremento en el nivel de autofagia y de aminoácidos, otorgándole a las plantas una resistencia que les permite sobrellevar mejor una condición de estrés. De esta manera, este mecanismo funcionaría como una señal de alerta que le permite a las plantas reducir su crecimiento debido a la limitación energética existente, y evitar una situación crítica de falta de energía que afecte procesos celulares esenciales.

Respecto a la segunda parte de esta tesis doctoral o **capítulo 2**, trabajamos con líneas sobreexpresantes de CYTc en arroz y maíz, caracterizando su crecimiento, lo que nos permitió llegar conclusiones generales provisionarias, las que deberán ser corroboradas realizando nuevas rondas de crecimiento de las plantas, en condiciones similares a las ensayadas, o evaluando otras, cuando se considere que deban ser realizados ajustes.

Así, identificamos 3 líneas de maíz (*ZmAtCYTc*) y 4 líneas de arroz (*OsAtCYTc*) con elevados niveles de *AtCYTc*, evaluados mediante experimentos de *Western Blot* con anticuerpos específicos. Observamos que la sobreexpresión de *AtCYTc* en plantas de maíz *ZmAtCYTc* crecidas en condiciones normales de nutrientes o bajo ligero déficit de N, no otorgan diferencias significativas en el crecimiento, tanto en parte aérea como radicular.

Por otro lado, la sobreexpresión de *AtCYTc* en plantas de arroz *OsAtCYTc* podría aumentar la biomasa de las plantas y la producción de semillas. Las plantas *OsAtCYTc* tienen aumentada la respiración celular total en hojas, y este aumento está dado por un aumento de la respiración dependiente de la vía COX. Es necesario profundizar el análisis de estas líneas de plantas de arroz y maíz, analizando el crecimiento bajo otras condiciones y con mayor número de replicas biológicas.

## 14. Bibliografía

- Adamo, M., Elias, C. A., Baena-gonzález, E., Coello, P., & Nacional, U. (2014). *Mechanisms of regulation of SNF1 / AMPK / SnRK1 protein kinases*. 5(May), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00190>
- 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. *Plant Cell*, 23(1), 185–209. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.074005>
- Anichtchik, O., Diekmann, H., Fleming, A., Roach, A., Goldsmith, P., & Rubinsztein, D. C. (2008). Loss of PINK1 function affects development and results in neurodegeneration in zebrafish. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(33), 8199–8207. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0979-08.2008>
- Araújo, W. L., Tohge, T., Ishizaki, K., Leaver, C. J., & Fernie, A. R. (2011). Protein degradation - an alternative respiratory substrate for stressed plants. *Trends in Plant Science*, 16(9), 489–498. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.05.008>
- Artins, A., & Caldana, C. (2022). The metabolic homeostaTOR: The balance of holding on or letting grow. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 66). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2022.102196>
- Artins, A., Urrea-castellanos, R., Martín-sánchez, M., Moraes, A., Fernie, A. R., Satake, A., & Caldana, C. (2023). FCS-Like Zinc finger 14 ( FLZ14 ) mediates the crosstalk between TORC and SnRK1 in response to sugar availability. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.08.14.553285>
- Attallah, C. V., Welchen, E., Martin, A. P., Spinelli, S. V., Bonnard, G., Palatnik, J. F., & Gonzalez, D. H. (2011). Plants contain two SCO proteins that are differentially involved in cytochrome c oxidase function and copper and redox homeostasis. *Journal of Experimental Botany*, 62(12), 4281–4294.
- Baena-González, E., Rolland, F., Thevelein, J. M., & Sheen, J. (2007). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature*, 448(7156), 938–942. <https://doi.org/10.1038/nature06069>
- Baena-González, E., & Sheen, J. (2008). Convergent energy and stress signaling. In *Trends in Plant Science* (Vol. 13, Issue 9, pp. 474–482). <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.06.006>
- Bantan-Polak, T., Kassai, M., & Grant, K. (2001). A comparison of fluorescamine and naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde fluorogenic reagents for microplate-based detection of amino acids. *Anal Biochem*, 297(2), 128–136.
- Barbet, N. C., Schneider, U., Helliwell, S. B., Stansfield, I., Tuite, M. F., & Hall, M. N. (1996). TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 7(1), 25–42. <https://doi.org/10.1091/MBC.7.1.25>
- Barrada, A., Djendli, M., Desnos, T., Mercier, R., Robaglia, C., Montané, M. H., & Menand, B. (2019). A TOR-YAK1 signaling axis controls cell cycle, meristem activity and plant growth in Arabidopsis. *Development (Cambridge, England)*, 146(3). <https://doi.org/10.1242/dev.171298>
- Bassham, D. C. (2007). Plant autophagy—more than a starvation response. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(6), 587–593.

<https://doi.org/10.1016/J.PBI.2007.06.006>

- Belda-Palazón, B., Costa, M., Beeckman, T., Rolland, F., & Baena-González, E. (2022). ABA represses TOR and root meristem activity through nuclear exit of the SnRK1 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *119*(28). <https://doi.org/10.1073/pnas.2204862119>
- Boussadia, O., Steppe, K., Zgallai, H., Ben El Hadj, S., Braham, M., Lemeur, R., & Van Labeke, M. C. (2010). Effects of nitrogen deficiency on leaf photosynthesis, carbohydrate status and biomass production in two olive cultivars 'Meski' and 'Koroneiki.' *Scientia Horticulturae*, *123*(3), 336–342. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2009.09.023>
- Boyes, D. C., Zayed, A. M., Ascenzi, R., Mccaskill, A. J., Hoffman, N. E., Davis, K. R., & Görlach, J. (2001). Growth Stage – Based Phenotypic Analysis of Arabidopsis: A Model for High Throughput Functional Genomics in Plants. *The Plant Cell*, *13*, 1499–1510. <https://doi.org/10.1105/TPC.010011>
- Brandt, T., Mourier, A., Tain, L. S., Partridge, L., Larsson, N. G., & Kühlbrandt, W. (2017). Changes of mitochondrial ultrastructure and function during ageing in mice and *Drosophila*. *ELife*, *6*, 1–19. <https://doi.org/10.7554/eLife.24662>
- Broda, M., Millar, A. H., & Van Aken, O. (2018). Mitophagy: A Mechanism for Plant Growth and Survival. In *Trends in Plant Science* (Vol. 23, Issue 5, pp. 434–450). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.02.010>
- Brunkard, J. O., Xu, M., Regina Scarpin, M., Chatterjee, S., Shemyakina, E. A., Goodman, H. M., & Zambryski, P. (2020). TOR dynamically regulates plant cell-cell transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(9), 5049–5058. <https://doi.org/10.1073/pnas.1919196117>
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (2015). *Biochemistry and molecular biology of plants* (2nd ed.). American Society of Plant Physiologists.
- Caldana, C., Li, Y., Leisse, A., Zhang, Y., Bartholomaeus, L., Fernie, A. R., Willmitzer, L., & Giavalisco, P. (2013). Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants reveal a general metabolic switch controlling growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, *73*(6), 897–909. <https://doi.org/10.1111/TPJ.12080>
- Cao, P., Kim, S.-J., Xing, A., Schenck, C. A., Liu, L., Jiang, N., Wang, J., Last, R. L., & Brandizzi, F. (2019). Homeostasis of branched-chain amino acids is critical for the activity of TOR signaling in *Arabidopsis*. *ELife*, *8*. <https://doi.org/10.7554/eLife.50747>
- Carrie, C., Murcha, M. W., Giraud, E., Ng, S., Zhang, M. F., Narsai, R., & Whelan, J. (2013). How do plants make mitochondria? *Planta*, *237*(2), 429–439. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1762-3>
- Cassman, K. G., Dobermann, A., & Walters, D. T. (2002). Agroecosystems, nitrogen-use efficiency, and nitrogen management. *Ambio*, *31*(2), 132–140. <https://doi.org/10.1579/0044-7447-31.2.132>
- Cassman, K. G., Dobermann, A., Walters, D. T., & Yang, H. (2003). MEETING CEREAL DEMAND WHILE PROTECTING NATURAL RESOURCES AND IMPROVING ENVIRONMENTAL QUALITY. *Annu. Rev. Environ. Resour*, *28*, 315–358. <https://doi.org/10.1146/annurev.energy.28.040202.122858>
- Charrier, B., Champion, A., Henry, Y., & Kreis, M. (2002). Expression profiling of the whole *Arabidopsis* shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Plant Physiol*, *130*(2), 577–590.

- <https://doi.org/10.1104/pp.009175>
- Chen, G. H., Liu, M. J., Xiong, Y., Sheen, J., & Wu, S. H. (2018). TOR and RPS6 transmit light signals to enhance protein translation in deetioliating Arabidopsis seedlings. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(50), 12823–12828. <https://doi.org/10.1073/pnas.1809526115>
- Chen, L., Su, Z., Huang, L., Xia, F., Qi, H., Xie, L., Xiao, S., & Chen, Q. (2017). The AMP-Activated Protein Kinase KIN10 Is Involved in the Regulation of Autophagy in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, *8*(July), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01201>
- Chun, L., Mi, G., Li, J., Chen, F., & Zhang, F. (n.d.). *Genetic analysis of maize root characteristics in response to low nitrogen stress*. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-5876-2>
- Colombatti, F., Gonzalez, D. H. D., & Welchen, E. (2014). Plant mitochondria under pathogen attack: A sigh of relief or a last breath? *Mitochondrion*, *19*(PB), 238–244. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.03.006>
- Colombatti, F., Mencia, R., Garcia, L., Mansilla, N., Alemano, S., Andrade, A. M. A. M., Gonzalez, D. H. D. H., & Welchen, E. (2019). The mitochondrial oxidation resistance protein AtOXR2 increases plant biomass and tolerance to oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, *70*(12), 3177–3195. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz147>
- Counce, P. A., Keisling, T. C., & Mitchell, A. J. (2000). A Uniform, Objective, and Adaptive System for Expressing Rice Development. *Crop Science*, *40*(2), 436–443. <https://doi.org/10.2135/CROPSCI2000.402436X>
- Creff, A., Sormani, R., & Desnos, T. (2010). *The two Arabidopsis RPS6 genes , encoding for cytoplasmic ribosomal proteins S6 , are functionally equivalent*. 533–546. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9639-y>
- Crepin, N., & Rolland, F. (2019). SnRK1 activation, signaling, and networking for energy homeostasis. *Current Opinion in Plant Biology*, *51*, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.03.006>
- Cunningham, J. T., Rodgers, J. T., Arlow, D. H., Vazquez, F., Mootha, V. K., & Puigserver, P. (2007). mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature*, *450*(7170), 736–740. <https://doi.org/10.1038/nature06322>
- Czarna, M., Kolodziejczak, M., & Janska, H. (2016). Mitochondrial Proteome Studies in Seeds during Germination. *Proteomes*, *4*(2). <https://doi.org/10.3390/PROTEOMES4020019>
- Dai, L., Wang, B., Wang, T., Meyer, E. H., Kettel, V., Hoffmann, N., McFarlane, H. E., Li, S., Wu, X., Picard, K. L., Giavalisco, P., Persson, S., & Zhang, Y. (2022). The TOR complex controls ATP levels to regulate actin cytoskeleton dynamics in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *119*(38), 1–12. <https://doi.org/10.1073/pnas.2122969119>
- De Clercq, I., Vermeirssen, V., Van Aken, O., Vandepoele, K., Murcha, M. W., Law, S. R., Inzé, A., Ng, S., Ivanova, A., Rombaut, D., van de Cotte, B., Jaspers, P., Van de Peer, Y., Kangasjärvi, J., Whelan, J., & Van Breusegem, F. (2013). The membrane-bound NAC transcription factor ANAC013 functions in mitochondrial retrograde regulation of the oxidative stress response in Arabidopsis. *Plant Cell*, *25*(9), 3472–3490. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.117168>
- Dennis, P. B., Jaeschke, A., Saitoh, M., Fowler, B., Kozma, S. C., & Thomas, G. (2001).

- Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5544), 1102–1105. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1063518>
- Deprost, D., Truong, H. N., Robaglia, C., & Meyer, C. (2005). An Arabidopsis homolog of RAPTOR/KOG1 is essential for early embryo development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 326(4), 844–850. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.117>
- Deprost, D., Yao, L., Sormani, R. R., Moreau, M., Leterreux, G., Bedu, M. M. M., Robaglia, C., Meyer, C., Nicolaï, M., Bedu, M. M. M., Robaglia, C., & Meyer, C. (2007). The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Reports*, 8(9), 864–870. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401043>
- Dobrenel, T., Mancera-Martínez, E., Forzani, C., Azzopardi, M., Davanture, M., Moreau, M., Schepetilnikov, M., Chicher, J., Langella, O., Zivy, M., Robaglia, C., Ryabova, L. A., Hanson, J., & Meyer, C. (2016). The arabidopsis TOR kinase specifically regulates the expression of nuclear genes coding for plastidic ribosomal proteins and the phosphorylation of the cytosolic ribosomal protein S6. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1611. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01611>
- Doelling, J. H., Walker, J. M., Friedman, E. M., Thompson, A. R., & Vierstra, R. D. (2002). The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in Arabidopsis thaliana. *Journal of Biological Chemistry*, 277(36), 33105–33114. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204630200>
- Endicott, S., Brueland, B., Keith, R., Schon, R., & Bremer, C. (2015). *Maíz, crecimiento y desarrollo*. [https://www.pioneer.com/CMRoot/International/Latin\\_America\\_Central/Chile/Servicios/Informacion\\_tecnica/Corn\\_Growth\\_and\\_Development\\_Spanish\\_Version.pdf](https://www.pioneer.com/CMRoot/International/Latin_America_Central/Chile/Servicios/Informacion_tecnica/Corn_Growth_and_Development_Spanish_Version.pdf)
- Findenegg, G. R. (1990). Effect of varied shoot/root ratio on growth of maize (*Zea mays*) under nitrogen-limited conditions: Growth experiment and model calculations. *Plant Nutrition - Physiology and Applications*, 41, 21–27.
- Flowers, T. J., & Yeo, A. R. (1995). Breeding for salinity resistance in crop plants: Where next? *Australian Journal of Plant Physiology*, 22(6), 875–884. <https://doi.org/10.1071/PP9950875>
- Forzani, C., Duarte, G. T., Van Leene, J., Clément, G., Huguet, S., Paysant-Le-Roux, C., Mercier, R., De Jaeger, G., Leprince, A. S., & Meyer, C. (2019). Mutations of the AtYAK1 Kinase Suppress TOR Deficiency in Arabidopsis. *Cell Reports*, 27(12), 3696–3708. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.074>
- Gao, K., Chen, F., Yuan, L., Zhang, F., & Mi, G. (2015). A comprehensive analysis of root morphological changes and nitrogen allocation in maize in response to low nitrogen stress. *Plant, Cell and Environment*, 38(4), 740–750. <https://doi.org/10.1111/PCE.12439>
- Garcia, L., Mansilla, N., Ocampos, N., Pagani, M. A., Welchen, E., & Gonzalez, D. H. (2019). The mitochondrial copper chaperone COX19 influences copper and iron homeostasis in arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 99(6), 621–638. <https://doi.org/10.1007/s11103-019-00840-y>
- Gaudin, A. C. M., McClymont, S. A., Holmes, B. M., Lyons, E., & Raizada, M. N. (2011). Novel temporal, fine-scale and growth variation phenotypes in roots of adult-stage maize (*Zea mays* L.) in response to low nitrogen stress. *Plant, Cell & Environment*, 34(12), 2122–2137. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3040.2011.02409.X>

- Gilkerson, R. W., Selker, J. M. L., & Capaldi, R. A. (2003). The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Letters*, *546*(2–3), 355–358. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00633-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00633-1)
- Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S. M., & Toulmin, C. (2010). Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science*, *327*(5967), 812–818. <https://doi.org/10.1126/science.1185383>
- González, F. G., Rigalli, N., Miranda, P. V., Romagnoli, M., Ribichich, K. F., Trucco, F., Portapila, M., Otegui, M. E., & Chan, R. L. (2020). An Interdisciplinary Approach to Study the Performance of Second-generation Genetically Modified Crops in Field Trials: A Case Study With Soybean and Wheat Carrying the Sunflower HaHB4 Transcription Factor. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 178. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00178>
- Goto-Yamada, S., Oikawa, K., Bizan, J., Shigenobu, S., Yamaguchi, K., Mano, S., Hayashi, M., Ueda, H., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., & Yamada, K. (2019). Sucrose Starvation Induces Microautophagy in Plant Root Cells. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01604>
- Gras, D. E., Mansilla, N., Rodríguez, C., Welchen, E., & Gonzalez, D. H. (2020). *Arabidopsis thaliana* SURFEIT1-like genes link mitochondrial function to early plant development and hormonal growth responses. *The Plant Journal*, *103*(2), 690–704. <https://doi.org/10.1111/tpj.14762>
- 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. *Molecular Cell*, *30*(2), 214–226. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2008.03.003>
- Hajdukiewicz, P. T. J., Allison, L. A., & Maliga, P. (1997). The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *The EMBO Journal*, *16*(13), 4041–4048. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/16.13.4041>
- Heinemann, B., & Hildebrandt, T. M. (2021). The role of amino acid metabolism in signaling and metabolic adaptation to stress-induced energy deficiency in plants. *Journal of Experimental Botany*, *72*(13), 4634–4645. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab182>
- Hendriks, J., Kolbe, A., Gibon, Y., Stitt, M., & Geigenberger, P. (2003). ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of *Arabidopsis* and other plant species. *Plant Physiol.*, *133*(2), 838–849.
- Hildebrandt, T. M., Nunes Nesi, A., Araújo, W. L., & Braun, H. P. (2015). Amino Acid Catabolism in Plants. In *Molecular Plant* (Vol. 8, Issue 11, pp. 1563–1579). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.09.005>
- Holz, M. K., Ballif, B. A., Gygi, S. P., & Blenis, J. (2021). mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell*, *184*(8), 2255. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2021.03.060>
- Huang, X., Zheng, C., Liu, F., Yang, C., Zheng, P., Lu, X., Tian, J., Chung, T., Otegui, M. S., Xiao, S., Gao, C., Vierstr, 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.

<https://doi.org/10.1105/tpc.19.00066>

- Ingargiola, C., Jéhanno, I., Forzani, C., Marmagne, A., Broutin, J., Clément, G., Leprince, A.-S., & Meyer, C. (2023). The Arabidopsis Target of Rapamycin kinase regulates ammonium assimilation and glutamine metabolism. *Plant Physiology*, *192*(4), 2943–2957. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiad216>
- Ishizaki, K., Schauer, N., Larson, T. R., Graham, I. A., Fernie, A. R., & Leaver, C. J. (2006). The mitochondrial electron transfer flavoprotein complex is essential for survival of Arabidopsis in extended darkness. *Plant Journal*, *47*(5), 751–760. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02826.x>
- Ivanova, A., Law, S. R., Narsai, R., Duncan, O., Lee, J. H., Zhang, B., Van Aken, O., Radomiljac, J. D., van der Merwe, M., Yi, K. K., & Whelan, J. (2014). A functional antagonistic relationship between auxin and mitochondrial retrograde signaling regulates alternative oxidase1a expression in arabidopsis. *Plant Physiology*, *165*(3), 1233–1254. <https://doi.org/10.1104/pp.114.237495>
- Jaaffar, Z., & Gardner, F. P. (1988). Canopy Development, Yield, and Market Quality in Peanut as Affected by Genotype and Planting Pattern. *Crop Science*, *28*(2), 299–305.
- Jamsheer, M., Jindal, S., Sharma, M., Awasthi, P., S, S., Sharma, M., Mannully, C. T., & Laxmi, A. (2022). A negative feedback loop of TOR signaling balances growth and stress-response trade-offs in plants. *Cell Reports*, *39*(1). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110631>
- Jones, C. M., Spor, A., Brennan, F. P., Breuil, M.-C., Bru, D., Lemanceau, P., Griffiths, B., Hallin, S., & Philippot, L. (2014). Recently identified microbial guild mediates soil N<sub>2</sub>O sink capacity. *Nature Climate Change*, *4*(9), 801–805. <https://doi.org/10.1038/nclimate2301>
- Kacprzak, S. M., Dahlqvist, A., & Van Aken, O. (2020). The transcription factor ANAC017 is a key regulator of mitochondrial proteotoxic stress responses in plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *375*(1801). <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0411>
- Kacprzak, S. M., & Van Aken, O. (2022). Carbon starvation, senescence and specific mitochondrial stresses, but not nitrogen starvation and general stresses, are major triggers for mitophagy in Arabidopsis. *Autophagy*, *18*(12), 2894–2912. <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2054039>
- Kim, S. G., Hoffman, G. R., Poulgiannis, G., Buel, G. R., Jang, Y. J., Lee, K. W., Kim, B. Y., Erikson, R. L., Cantley, L. C., Choo, A. Y., & Blenis, J. (2013). Metabolic Stress Controls mTORC1 Lysosomal Localization and Dimerization by Regulating the TTT-RUVBL1/2 Complex. *Molecular Cell*, *49*(1), 172–185. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.003>
- Kim, Y. K., Kim, S., Shin, Y. J., Hur, Y. S., Kim, W. Y., Lee, M. S., Cheon, C. I., & Verma, D. P. S. (2014). Ribosomal protein s6, a target of rapamycin, is involved in the regulation of rRNA genes by possible epigenetic changes in arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(7). <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.515015>
- Koornneef, M., & Meinke, D. (2010). The development of Arabidopsis as a model plant. *Plant Journal*, *61*(6), 909–921. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04086.x>
- Krämer, U. (2015). Planting molecular functions in an ecological context with Arabidopsis thaliana. *ELife*, *4*, 1–13. <https://doi.org/10.7554/eLife.06100>
- Kühn, K., Yin, G., Duncan, O., Law, S. R., Kubiszewski-Jakubiak, S., Kaur, P., Meyer,

- E., Wang, Y., Des Francs Small, C. C., Giraud, E., Narsai, R., & Whelan, J. (2015). Decreasing electron flux through the cytochrome and/or alternative respiratory pathways triggers common and distinct cellular responses dependent on growth conditions. *Plant Physiology*, *167*(1), 228–250. <https://doi.org/10.1104/pp.114.249946>
- Leslie, A. G. W., Abrahams, J. P., Braig, K., Lutter, R., Menz, R. I., Orriss, G. L., Van Raaij, M. J., & Walker, J. E. (1999). The structure of bovine mitochondrial F1-ATPase: an example of rotary catalysis. *Biochemical Society Transactions*, *27*(2), 37–42. <https://doi.org/10.1042/BST0270037>
- Li, X., Cai, W., Liu, Y., Li, H., Fu, L., Liu, Z., Xu, L., Liu, H., Xu, T., & Xiong, Y. (2017). Differential TOR activation and cell proliferation in Arabidopsis root and shoot apices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(10), 2765–2770. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618782114>
- Liao, C. Y., Pu, Y., Nolan, T. M., Montes, C., Guo, H., Walley, J. W., Yin, Y., & Bassham, D. C. (2023). Brassinosteroids modulate autophagy through phosphorylation of RAPTOR1B by the GSK3-like kinase BIN2 in Arabidopsis. *Autophagy*, *19*(4), 1293–1310. <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2124501>
- Ling, N. X. Y., Kaczmarek, A., Hoque, A., Davie, E., Ngoei, K. R. W., Morrison, K. R., Smiles, W. J., Forte, G. M., Wang, T., Lie, S., Dite, T. A., Langendorf, C. G., Scott, J. W., Oakhill, J. S., & Petersen, J. (2020). mTORC1 directly inhibits AMPK to promote cell proliferation under nutrient stress. *Nature Metabolism*, *2*(1), 41–49. <https://doi.org/10.1038/S42255-019-0157-1>
- Liu, S., Liu, S., He, B., Li, L., Li, L., Wang, J., Cai, T., Chen, S., & Jiang, H. (2021). OXPHOS deficiency activates global adaptation pathways to maintain mitochondrial membrane potential. *EMBO Reports*, *22*(4). <https://doi.org/10.15252/EMBR.202051606>
- Liu, Yanlin, Duan, X., Zhao, X., Ding, W., Wang, Y., & Xiong, Y. (2021). Diverse nitrogen signals activate convergent ROP2-TOR signaling in Arabidopsis. *Developmental Cell*, *56*(9), 1283–1295. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.03.022>
- Liu, Yimo, & Bassham, D. C. (2010). TOR Is a Negative Regulator of Autophagy in Arabidopsis thaliana. *PLoS ONE*, *5*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011883>
- Lutt, N., & Brunkard, J. O. (2022). Amino Acid Signaling for TOR in Eukaryotes: Sensors, Transducers, and a Sustainable Agricultural fuTORe. *Biomolecules*, *12*(3), 387. <https://doi.org/10.3390/BIOM12030387>
- Ma, J., Liang, Z., Zhao, J., Wang, P., Ma, W., Mai, K. K., Fernandez Andrade, J. A., Zeng, Y., Grujic, N., Jiang, L., Dagdas, Y., & Kang, B. H. (2021). Friendly mediates membrane depolarization-induced mitophagy in Arabidopsis. *Current Biology*, *31*(9), 1931–1944.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.02.034>
- MacKintosh, C. (1992). Regulation of spinach-leaf nitrate reductase by reversible phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1137*(1), 121–126. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(92\)90109-O](https://doi.org/10.1016/0167-4889(92)90109-O)
- Magen, S., Seybold, H., Laloum, D., & Avin-Wittenberg, T. (2022). Metabolism and autophagy in plants—a perfect match. *FEBS Letters*, *596*(17), 2133–2151. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14359>
- Mair, A., Pedrotti, L., Wurzinger, B., Anrather, D., Simeunovic, A., Weiste, C., Valerio, C., Dietrich, K., Kirchler, T., Nägele, T., Carbajosa, J. V., Hanson, J., Baena-

- González, E., Chaban, C., Weckwerth, W., Dröge-Laser, W., & Teige, M. (2015). SnRK1-triggered switch of bZIP63 dimerization mediates the low-energy response in plants. *ELife*, 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.05828>
- Mansilla, N., Racca, S., Gras, D. E., Gonzalez, D. H., & Welchen, E. (2018). The complexity of mitochondrial complex iv: An update of cytochrome c oxidase biogenesis in plants. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 3, p. 662). <https://doi.org/10.3390/ijms19030662>
- Margalha, L., Confraria, A., & Baena-González, E. (2019). SnRK1 and TOR: Modulating growth–defense trade-offs in plant stress responses. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 70, Issue 8, pp. 2261–2274). <https://doi.org/10.1093/jxb/erz066>
- Massignam, A. M., Chapman, S. C., Hammer, G. L., & Fukai, S. (2012). Effects of nitrogen supply on canopy development of maize and sunflower. *Crop and Pasture Science*, 62(12), 1045–1055. <https://doi.org/10.1071/CP11165>
- McMichael, R. W., Kochansky, J., Klein, R. R., & Huber, S. C. (1995). Characterization of the substrate specificity of sucrose-phosphate synthase protein kinase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 321(1), 71–75. <https://doi.org/10.1006/ABBI.1995.1369>
- Mencia, R., Céccoli, G., Fabro, G., Torti, P., Colombatti, F., Ludwig-Müller, J., Alvarez, M. E., & Welchen, E. (2020). OXR2 Increases Plant Defense against a Hemibiotrophic Pathogen via the Salicylic Acid Pathway. *Plant Physiology*, 184(2), 1112–1127. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01351>
- Menegollo, M., Tessari, I., Bubacco, L., & Szabadkai, G. (2019). Determination of ATP, ADP, and AMP levels by reversed-phase high-performance liquid chromatography in cultured cells. *Methods Mol Biol.*, 1925, 223–232.
- Meyer, E. H., Welchen, E., & Carrie, C. (2019). Assembly of the Complexes of the Oxidative Phosphorylation System in Land Plant Mitochondria. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 70, Issue 1, pp. 23–50). <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100412>
- Montes, C., Wang, P., Liao, C. Y., Nolan, T. M., Song, G., Clark, N. M., Elmore, J. M., Guo, H., Bassham, D. C., Yin, Y., & Walley, J. W. (2022). Integration of multi-omics data reveals interplay between brassinosteroid and Target of Rapamycin Complex signaling in Arabidopsis. *New Phytologist*, 236(3), 893–910. <https://doi.org/10.1111/nph.18404>
- Muchow, R. C., & Davis, R. (1988). Effect of nitrogen supply on the comparative productivity of maize and sorghum in a semi-arid tropical environment II. Radiation interception and biomass accumulation. *Field Crops Research*, 18(1), 17–30. [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(88\)90056-1](https://doi.org/10.1016/0378-4290(88)90056-1)
- Mueller, N., West, P., Gerber, J., Mac Donald, G., Polasky, S., & Foley, J. (2014). A tradeoff frontier for global nitrogen use and cereal production. *Environmental Research Letters*, 9(5), 054002. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/9/5/054002>
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment*, 25(2), 239–250. <https://doi.org/10.1046/J.0016-8025.2001.00808.X>
- Neff, M. M. (2012). Light-mediated seed germination: connecting phytochrome B to gibberellic acid. *Developmental Cell*, 22(4), 687–688. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2012.04.003>
- Ng, S., De Clercq, I., Van Aken, O., Law, S. R., Ivanova, A., Willems, P., Giraud, E., Van Breusegem, F., & Whelan, J. (2014). Anterograde and retrograde regulation of

- nuclear genes encoding mitochondrial proteins during growth, development, and stress. *Molecular Plant*, 7(7), 1075–1093. <https://doi.org/10.1093/mp/ssu037>
- Ng, S., Ivanova, A., Duncan, O., Law, S. R., Van Aken, O., De Clercq, I., Wang, Y., Carrie, C., Xu, L., Kmiec, B., Walker, H., Van Breusegem, F., Whelan, J., & Giraud, E. (2013). A membrane-bound NAC transcription factor, ANAC017, mediates mitochondrial retrograde signaling in Arabidopsis. *Plant Cell*, 25(9), 3450–3471. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.113985>
- Nicastro, R., Brohée, L., Alba, J., Nüchel, J., Figlia, G., Kipschull, S., Gollwitzer, P., Romero-Pozuelo, J., Fernandes, S. A., Lamprakis, A., Vanni, S., Teleman, A. A., De Virgilio, C., & Demetriades, C. (2023). Malonyl-CoA is a conserved endogenous ATP-competitive mTORC1 inhibitor. *Nature Cell Biology*, 25(9), 1303–1318. <https://doi.org/10.1038/s41556-023-01198-6>
- Nicastro, R., Raucchi, S., Michel, A. H., Stumpe, M., Osuna, G. M. G., Jaquenoud, M., Kornmann, B., & de Virgilio, C. (2021). Indole-3-acetic acid is a physiological inhibitor of TORC1 in yeast. *PLoS Genetics*, 17(3), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009414>
- Nukarinen, E., Ngele, T., Pedrotti, L., Wurzing, B., Mair, A., Landgraf, R., Börnke, F., Hanson, J., Teige, M., Baena-Gonzalez, E., Dröge-Laser, W., & Weckwerth, W. (2016). Quantitative phosphoproteomics reveals the role of the AMPK plant ortholog SnRK1 as a metabolic master regulator under energy deprivation. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/SREP31697>
- O'Leary, B. M., Oh, G. G. K., Lee, C. P., & Millar, A. H. (2019). Metabolite Regulatory Interactions Control Plant Respiratory Metabolism via Target of Rapamycin (TOR) Kinase Activation. *The Plant Cell*, 32(3), 666–682. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00157>
- Ow, Y. L. P., Green, D. R., Hao, Z., & Mak, T. W. (2008). Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(7), 532–542. <https://doi.org/10.1038/NRM2434>
- Pachauri, R. K., Allen, M. R., Barros, V. R., Broome, J., Cramer, W., Christ, R., & van Ypersele, J. P. (2014). *Climate change 2014: synthesis report. Contribution of Working Groups I, II and III to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (Ippc)*.
- Palikaras, K., Lionaki, E., & Tavernarakis, N. (2018). Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. *Nature Cell Biology* 2018 20:9, 20(9), 1013–1022. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0176-2>
- Park, S. H., Yi, N., Kim, Y. S., Jeong, M. H., Bang, S. W., Choi, Y. Do, & Kim, J. K. (2010). Analysis of five novel putative constitutive gene promoters in transgenic rice plants. *Journal of Experimental Botany*, 61(9), 2459–2467. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERQ076>
- Paszkiwicz, G., Gualberto, J. M., Benamar, A., Macherel, D., & Logan, D. C. (2017). Arabidopsis seed mitochondria are bioenergetically active immediately upon imbibition and specialize via biogenesis in preparation for autotrophic growth. *The Plant Cell*, 29(1). <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00700>
- Pedrotti, L., Weiste, C., Nägele, T., Wolf, E., Lorenzin, F., Dietrich, K., Mair, A., Weckwerth, W., Teige, M., Baena-González, E., & Dröge-Laser, W. (2018). Snf1-RELATED KINASE1-Controlled C/S 1 -bZIP Signaling Activates Alternative Mitochondrial Metabolic Pathways to Ensure Plant Survival in Extended Darkness. *The Plant Cell*, 30(2), 495–509. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00414>

- Penfield, S. (2017). Seed dormancy and germination. *Current Biology: CB*, 27(17), R874–R878. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2017.05.050>
- Pfanner, N., van der Laan, M., Amati, P., Capaldi, R. A., Caudy, A. A., Chacinska, A., Darshi, M., Deckers, M., Hoppins, S., Icho, T., Jakobs, S., Ji, J., Kozjak-Pavlovic, V., Meisinger, C., Odgren, P. R., Park, S. K., Rehling, P., Reichert, A. S., Sheikh, M. S., ... Nunnari, J. (2014). Uniform nomenclature for the mitochondrial contact site and cristae organizing system. *The Journal of Cell Biology*, 204(7), 1083–1086. <https://doi.org/10.1083/JCB.201401006>
- Pickles, S., Vigié, P., & Youle, R. J. (2018). Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Current Biology*, 28(4), R170–R185. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2018.01.004>
- Pu, Y., Soto-Burgos, J., & Bassham, D. C. (2017). Regulation of autophagy through SnRK1 and TOR signaling pathways. *https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1395128*, 12(12), e1395128. <https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1395128>
- Racca, S., Gras, D. E., Canal, M. V., Ferrero, L. V., Rojas, B. E., Figueroa, C. M., Ariel, F. D., Welchen, E., & Gonzalez, D. H. (2022). Cytochrome c and the transcription factor ABI4 establish a molecular link between mitochondria and ABA-dependent seed germination. *New Phytologist*, 235(5), 1780–1795. <https://doi.org/10.1111/NPH.18287>
- Racca, S., Welchen, E., Gras, D. E., Tarkowská, D., Turečková, V., Maurino, V. G., Gonzalez, D. H., Tarkowska, D., Tureckova, V., Maurino, V. G., & Gonzalez, D. H. (2018). Interplay between cytochrome c and gibberellins during Arabidopsis vegetative development. *The Plant Journal*, 94(1), 105–121. <https://doi.org/10.1111/tpj.13845>
- Ramanathan, A., & Schreiber, S. L. (2009). Direct control of mitochondrial function by mTOR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(52), 22229–22232. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912074106>
- Raveneau, M., Benamar, A., & Macherel, D. (2017). Water content, adenylate kinase, and mitochondria drive adenylate balance in dehydrating and imbibing seeds. *J Exp Bot*, 68(13), 3501–3512.
- Ré, D. A., Cambiagno, D. A., Arce, A. L., Tomassi, A. H., Giustozzi, M., Casati, P., Ariel, F. D., Manavella, P. A., Verslues, P. E., Thieme, C. J., Rojas-Triana, M., Stecyk, E., Schudoma, C., Zhang, W., Yang, L., Mināmbres, M., Walther, D., Schulze, W. X., Paz-Ares, J., ... Manavella, P. A. (2020). CURLY LEAF Regulates MicroRNA Activity by Controlling ARGONAUTE 1 Degradation in Plants. *Molecular Plant*, 13(1), 72–87. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.10.003>
- Riegler, S., Servi, L., Scarpin, M. R., Godoy Herz, M. A., Kubaczka, M. G., Venhuizen, P., Meyer, C., Brunkard, J. O., Kalyna, M., Barta, A., & Petrillo, E. (2021). Light regulates alternative splicing outcomes via the TOR kinase pathway. *Cell Reports*, 36(10), 109676. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109676>
- Robertlee, J., Kobayashi, K., Suzuki, M., & Muranaka, T. (2017). AKIN10, a representative Arabidopsis SNF1-related protein kinase 1 (SnRK1), phosphorylates and downregulates plant HMG-CoA reductase. *FEBS Letters*, 591(8), 1159–1166. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12618>
- Salem, M. A., Li, Y., Bajdzienko, K., Fisahn, J., Watanabe, M., Hoefgen, R., Schöttler, M. A., & Giavalisco, P. (2018). RAPTOR controls developmental growth transitions by altering the hormonal and metabolic balance. *Plant Physiology*, 177(2), 565–593.

- <https://doi.org/10.1104/PP.17.01711>
- Salem, M. A., Li, Y., Wiszniewski, A., & Giavalisco, P. (2017). Regulatory-associated protein of TOR (RAPTOR) alters the hormonal and metabolic composition of Arabidopsis seeds, controlling seed morphology, viability and germination potential. *Plant Journal*, *92*(4), 525–545. <https://doi.org/10.1111/tpj.13667>
- 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*, *9*, 1–34. <https://doi.org/10.7554/eLife.58795>
- Schägger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, *1*(1), 16–22. <https://doi.org/10.1038/NPROT.2006.4>
- Schaufelberger, M., Galbier, F., Herger, A., De Brito Francisco, R., Roffler, S., Clement, G., Diet, A., Hörtensteiner, S., Wicker, T., & Ringli, C. (2019). Mutations in the Arabidopsis ROL17/isopropylmalate synthase 1 locus alter amino acid content, modify the TOR network, and suppress the root hair cell development mutant lrx1. *Journal of Experimental Botany*, *70*(8), 2313–2323. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERY463>
- Schepetilnikov, M., Dimitrova, M., Mancera-Martínez, E., Geldreich, A., Keller, M., & Ryabova, L. A. (2013). TOR and S6K1 promote translation reinitiation of uORF-containing mRNAs via phosphorylation of eIF3h. *EMBO Journal*, *32*(8), 1087–1102. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2013.61>
- Schepetilnikov, M., Makarian, J., Srour, O., Geldreich, A., Yang, Z., Chicher, J., Hammann, P., & Ryabova, L. A. (2017). GTPase ROP 2 binds and promotes activation of target of rapamycin, TOR, in response to auxin. *The EMBO Journal*, *36*(7), 886–903. <https://doi.org/10.15252/embj.201694816>
- Schepetilnikov, M., & Ryabova, L. A. (2018). Recent discoveries on the role of tor (Target of rapamycin) signaling in translation in plants. *Plant Physiology*, *176*(2), 1095–1105. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01243>
- Schmitt, V., & Van Aken, O. (2023). Mitophagy: From the dark into the spotlight. *Molecular Plant*, *16*(10), 1487–1489. <https://doi.org/10.1016/J.MOLP.2023.08.015>
- Sela, S., Woodbury, P., & Van Es, H. (2018). Dynamic model-based N management reduces surplus nitrogen and improves the environmental performance of corn production. *Environmental Research Letters*, *13*(5), 054010. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/AAB908>
- Shen, W., Reyes, M. I., & Hanley-Bowdoin, L. (2009). Arabidopsis protein kinases GRIK1 and GRIK2 specifically activate SnRK1 by phosphorylating its activation loop. *Plant Physiology*, *150*(2), 996–1005. <https://doi.org/10.1104/PP.108.132787>
- Shi, L., Wu, Y., & Sheen, J. (2018). TOR signaling in plants: conservation and innovation. *Development*, *145*(13). <https://doi.org/10.1242/dev.160887>
- Shu, K., Liu, X. D., Xie, Q., & He, Z. H. (2016). Two Faces of One Seed: Hormonal Regulation of Dormancy and Germination. In *Molecular Plant* (Vol. 9, Issue 1, pp. 34–45). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.08.010>
- Signorelli, S., Tarkowski, Ł. P., Van den Ende, W., & Bassham, D. C. (2019). Linking Autophagy to Abiotic and Biotic Stress Responses. *Trends in Plant Science*, *24*(5), 413–430. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2019.02.001>
- Soto-Burgos, J., & Bassham, D. C. (2017). SnRK1 activates autophagy via the TOR signaling pathway in Arabidopsis thaliana. *PLoS ONE*, *12*(8), e0182591.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182591>

- Stephan, J. S., Yeh, Y. Y., Ramachandran, V., Deminoff, S. J., & Herman, P. K. (2009). The Tor and PKA signaling pathways independently target the Atg1/Atg13 protein kinase complex to control autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(40), 17049–17054. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0903316106>
- Stitt, M., McC. Lilley, R., Gerhardt, R., & Heldt, H. (1989). Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves, *Methods in Enzymology*, *174*, 518–552.
- Sundström, J. F., Albiñ, A., Boqvist, S., Ljungvall, K., Marstorp, H., Martiin, C., Nyberg, K., Vågsholm, I., Yuen, J., & Magnusson, U. (2014). Future threats to agricultural food production posed by environmental degradation, climate change, and animal and plant diseases – a risk analysis in three economic and climate settings. *Food Security*, *6*(2), 201–215. <https://doi.org/10.1007/s12571-014-0331-y>
- 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. *The Plant Cell*, *23*(10), 3761–3779. <https://doi.org/10.1105/TPC.111.090993>
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal* (1st ed.).
- Tao, Z., Barker, J., Shi, S. D. H., Gehring, M., & Sun, S. (2010). Steady-state kinetic and inhibition studies of the mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase domain and mTOR complexes. *Biochemistry*, *49*(39), 8488–8498. <https://doi.org/10.1021/bi100673c>
- Thompson, A. R., Doelling, J. H., Suttangkakul, A., & Vierstra, R. D. (2005). Autophagic nutrient recycling in Arabidopsis directed by the ATG8 and ATG12 conjugation pathways. *Plant Physiology*, *138*(4), 2097–2110. <https://doi.org/10.1104/PP.105.060673>
- Toral-Barza, L., Zhang, W. G., Lamison, C., LaRocque, J., Gibbons, J., & Yu, K. (2005). Characterization of the cloned full-length and a truncated human target of rapamycin: activity, specificity, and enzyme inhibition as studied by a high capacity assay. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *332*(1), 304–310. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2005.04.117>
- Van Leene, J., Han, C., Gadeyne, A., Eeckhout, D., Matthijs, C., Cannoot, B., De Winne, N., Persiau, G., Van De Slijke, E., Van de Cotte, B., Stes, E., Van Bel, M., Storme, V., Impens, F., Gevaert, K., Vandepoele, K., De Smet, I., & De Jaeger, G. (2019). Capturing the phosphorylation and protein interaction landscape of the plant TOR kinase. *Nature Plants*, *5*(3), 316–327. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0378-z>
- Vermeulen, S. J., Campbell, B. M., & Ingram, J. S. I. (2012). *Climate Change and Food Systems*. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-020411-130608>
- Vogel, F., Bornhövd, C., Neupert, W., & Reichert, A. S. (2006). Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *The Journal of Cell Biology*, *175*(2), 237–247. <https://doi.org/10.1083/JCB.200605138>
- Voon, C. P., Guan, X., Sun, Y., Sahu, A., Chan, M. N., Gardeström, P., Wagner, S., Fuchs, P., Nietzel, T., Versaw, W. K., Schwarzländer, M., & Lim, B. L. (2018). ATP compartmentation in plastids and cytosol of Arabidopsis thaliana revealed by fluorescent protein sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(45), 10778–10787. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711497115>

- Vos, J., Van Der Putten, P. E. L., & Birch, C. J. (2005). Effect of nitrogen supply on leaf appearance, leaf growth, leaf nitrogen economy and photosynthetic capacity in maize (*Zea mays* L.). *Field Crops Research*, 93(1), 64–73. <https://doi.org/10.1016/J.FCR.2004.09.013>
- Wang, H. L., Chou, A. H., Wu, A. S., Chen, S. Y., Weng, Y. H., Kao, Y. C., Yeh, T. H., Chu, P. J., & Lu, C. S. (2011). PARK6 PINK1 mutants are defective in maintaining mitochondrial membrane potential and inhibiting ROS formation of substantia nigra dopaminergic neurons. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1812(6), 674–684. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2011.03.007>
- Wang, Y., Qin, Y., Li, B., Zhang, Y., & Wang, L. (2020). Attenuated TOR signaling lengthens circadian period in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior*, 15(2). <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1710935>
- Wei, S., Wang, X., Zhang, J., Liu, P., Zhao, B., Li, G., & Dong, S. (2015). The role of nitrogen in leaf senescence of summer maize and analysis of underlying mechanisms using comparative proteomics. *Plant Science*, 233, 72–81. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2015.01.002>
- Welchen, E., Canal, M. V., Gras, D. E., & Gonzalez, D. H. (2021). Cross-talk between mitochondrial function, growth, and stress signalling pathways in plants. *Journal of Experimental Botany*, 72(11), 4102–4118. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa608>
- Welchen, E., García, L., Mansilla, N., & Gonzalez, D. H. (2014). Coordination of plant mitochondrial biogenesis: keeping pace with cellular requirements. *Frontiers in Plant Science*, 4, 551. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3884152&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Welchen, E., & Gonzalez, D. H. (2005). Differential expression of the Arabidopsis cytochrome c genes *Cytc-1* and *Cytc-2*. Evidence for the involvement of TCP-domain protein-binding elements in anther- and meristem-specific expression of the *Cytc-1* gene. *Plant Physiology*, 139(1), 88–100. <https://doi.org/10.1104/pp.105.065920>
- Welchen, E., & Gonzalez, D. H. (2016). Cytochrome c, a hub linking energy, redox, stress and signaling pathways in mitochondria and other cell compartments. *Physiologia Plantarum*, 157(3), 310–321. <https://doi.org/10.1111/ppl.12449>
- Welchen, E., & Gonzalez, D. H. (2021). Breaking boundaries: exploring short- and long-distance mitochondrial signalling in plants. *New Phytologist*, 232(2), 494–501. <https://doi.org/10.1111/nph.17614>
- Welchen, E., Hildebrandt, T. M., Lewejohann, D., Gonzalez, D. H., & Braun, H. P. (2012). Lack of cytochrome c in Arabidopsis decreases stability of Complex IV and modifies redox metabolism without affecting Complexes I and III. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1817(7), 990–1001. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.04.008>
- Welchen, E., Schmitz, J., Fuchs, P., García, L., Wagner, S., Wienstroer, J., Schertl, P., Braun, H. P., Schwarzländer, M., Gonzalez, D. H., & Maurino, V. G. (2016). D-lactate dehydrogenase links methylglyoxal degradation and electron transport through cytochrome. *Plant Physiology*, 172(2), 901–912. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01174>
- Xiong, Y., McCormack, M., Li, L., Hall, Q., Xiang, C., & Sheen, J. (2013). Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature*, 496(7444), 181–186. <https://doi.org/10.1038/nature12030>

- Yang, C., Li, X., Yang, L., Chen, S., Liao, J., Li, K., Zhou, J., Shen, W., Zhuang, X., Bai, M., Bassham, D. C., & Gao, C. (2023). A positive feedback regulation of SnRK1 signaling by autophagy in plants. *Molecular Plant*, *16*(7), 1192–1211. <https://doi.org/10.1016/J.MOLP.2023.07.001>
- Yang, X., & Bassham, D. C. (2015). New Insight into the Mechanism and Function of Autophagy in Plant Cells. *International Review of Cell and Molecular Biology*, *320*, 1–40. <https://doi.org/10.1016/BS.IRCMB.2015.07.005>
- 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), 2914–2927. <https://doi.org/10.1105/TPC.109.068635>
- Zhai, Z., Keereetaweep, J., Liu, H., Feil, R., Lunn, J. E., & Shanklin, J. (2018). Trehalose 6-Phosphate Positively Regulates Fatty Acid Synthesis by Stabilizing WRINKLED1. *The Plant Cell*, *30*(10), 2616–2627. <https://doi.org/10.1105/TPC.18.00521>
- Zhang, N., Meng, Y., Li, X., Zhou, Y., Ma, L., Fu, L., Schwarzländer, M., Liu, H., & Xiong, Y. (2019). Metabolite-mediated TOR signaling regulates the circadian clock in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(51), 25395–25397. <https://doi.org/10.1073/pnas.1913095116>
- Zhang, Y., Primavesi, L. F., Jhurreea, D., Andralojc, P. J., Mitchell, R. A. C., Powers, S. J., Schluempmann, H., Delatte, T., Wingler, A., & Paul, M. J. (2009). Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiology*, *149*(4), 1860–1871. <https://doi.org/10.1104/PP.108.133934>
- Zimorski, V., Ku, C., Martin, W. F., & Gould, S. B. (2014). Endosymbiotic theory for organelle origins. *Current Opinion in Microbiology*, *22*, 38–48. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2014.09.008>