

Influencia del Oligo-Carragenano Kappa en el metabolismo de *Eucalyptus globulus*



Influencia del Oligo-Carragenano Kappa en el metabolismo de *Eucalyptus globulus*

Publicado por: Universidad Técnica Estatal de Quevedo.
Dir. Av. Quito km 1½ vía a Santo Domingo de los Tsáchilas,
Quevedo, Ecuador. www.uteq.edu.ec.

Derechos reservados: © Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador 2025.
Dirección de Investigación Ciencia y Tecnología (DICYT).
Se autoriza la reproducción de esta publicación con fines educativos y otros que no sean comerciales sin permiso escrito previo detentar el derecho de autor, mencionando la cita.

Cita del libro: Saucedo S. 2025. Influencia del Oligo-Carragenano Kappa en el metabolismo de *Eucalyptus globulus*. 81 pp.

Revisión de Pares Externos: Aura Julissa Arcentales Montalvo
Magister en formulación evaluación y gestión de proyectos
Universidad Técnica Luis Vargas Torres de Esmeraldas

Viviana Lisseth Suarez Chichande
Magister en agroecología y desarrollo sostenible
Investigador independiente

Primera Edición: Quevedo, Junio del 2025.

ISBN: 978-9942-666-29-1

Equipo Editorial: Econ. Carlos Edison Zambrano, Ph.D.
Director

Ing. Javier Patiño Uyaguari, M.Sc.

Revisión y Corrección

Ing. J. Bladimir Mora Macías

Edición y Diagramación



ISBN: 978-9942-666-29-1



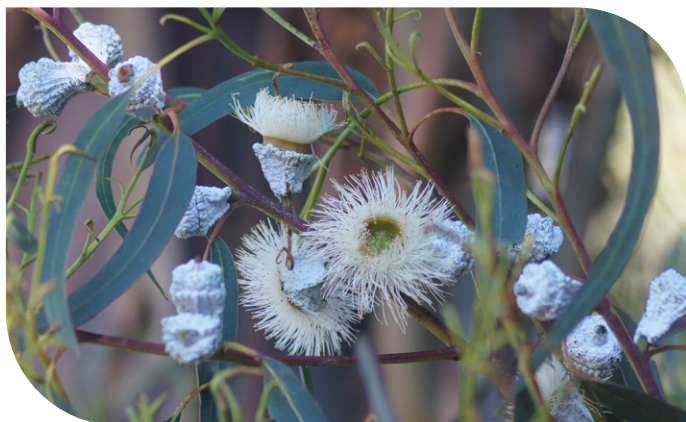
Derechos de Autor © 2025

Silvia Gicela Saucedo Aguiar

► Presentación

El Comité Editorial de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ) es la unidad encargada de promover, gestionar y administrar el conocimiento resultante de las actividades de investigación científica, la docencia y la vinculación de docentes y estudiantes. Dentro del procedimiento para el reconocimiento al profesorado y estudiantado de la UTEQ se contempla la publicación como libros de proyectos de investigación o trabajos en el ámbito académico de profesores y estudiantes de grado y posgrado relacionados con las líneas de investigación institucionales.

El Proyecto de Investigación en opción al grado de Doctor en Biotecnología de Silvia Gicela Saucedo Aguiar, obtenido en la “Universidad Santiago de Chile”, atiende a la normativa existente para ser publicado como libro y por ello el Comité Editorial de la UTEQ aprueba la visibilidad y acceso a la comunidad académica, científica y sociedad en general.



► **Influencia del Oligo-Carragenano Kappa en el metabolismo de *Eucalyptus globulus***

AUTORA:

Silvia Gicela Saucedo Aguiar



ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	10
AGRADECIMIENTO.....	11
INTRODUCCIÓN.....	14
1. Eucalyptus globulus.....	14
2. La quinasa Target Of Rapamycin (TOR).....	15
3. Vía de señalización de TOR en plantas.....	16
3.1. Regulación de TOR en plantas.....	18
3.2. Activación y represión de señalización de TOR.....	19
3.3. Señalización glucosa-TOR.....	20
3.4. Señalización nutrientes-TOR.....	21
3.5. Señalización fitohormonas-TOR.....	22
3.6. TOR y ciclo circadiano.....	23
3.7. TOR y cambios epigenéticos.....	24
4. Estimulación del crecimiento en plantas mediada por elicitores.....	27
4.1. Regulación del crecimiento de plantas mediada por oligosacáridos de algas marinas 13 HIPÓTESIS.....	27
OBJETIVO GENERAL.....	30
OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
1. Cultivo y tratamiento de plantas de Eucalyptus con OC Kappa.....	31
2. Medición de la altura de las plantas.....	31
3. Cuantificación de la fotosíntesis.....	32
4. Cuantificación de la clorofila a y b.....	32
5. Cuantificación de glucosa.....	32
6. Cuantificación de trehalosa.....	33
7. Preparación de extractos proteicos.....	34
8. Detección de TOR fosforilado (TOR-P).....	34
9. Extracción de ARN total.....	35
10. Diseño de primarios para PCR en tiempo real.....	36

11. Cuantificación de transcritos mediante qRT-PCR.....	38
12. Análisis estadísticos.....	38

RESULTADOS.....39

1. Aumento en la altura y la fotosíntesis neta inducido por OC kappa.....	39
2. Aumento de la clorofila total inducido por OC kappa.....	40
3. Aumento en el nivel de glucosa inducido por OC kappa.....	41
4. Aumento de la síntesis de trehalosa inducido por OC kappa.....	42
5. Aumento en el nivel de TOR-P y en los transcritos de TOR inducido por OC kappa.....	43
6. Incremento en el nivel relativo de transcritos en enzimas involucradas en la producción de glucosa y almidón inducido por OC kappa.....	45
7. Aumento en el nivel relativo de transcritos en proteínas de fotosistemas y enzima de síntesis de clorofila inducido por OC kappa.....	47
8. Aumento en el nivel relativo de transcritos de enzimas del metabolismo primario inducido por OC kappa.....	48
9. Aumento en el nivel relativo de transcritos de enzimas del metabolismo secundario inducido por OC kappa.....	52

DISCUSIÓN.....54

1. OC kappa induce el aumento de la altura y la fotosíntesis.....	54
2. OC kappa induce aumento en los niveles de glucosa y trehalosa.....	54
3. OC kappa induce el incremento en el nivel de TOR-P y de transcritos TOR.....	56
4. OC kappa induce aumento en el nivel de transcritos que codifican proteínas de fotosistemas y síntesis de clorofila.....	57
5. OC-kappa induce el incremento en el nivel de transcritos que codifican enzimas del metabolismo basal y secundario.....	57
6. Modelo de activación de la vía TOR inducido por OC kappa.....	58
Referencias Bibliográficas.....	62
Reseña de Autora.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Vía de señalización TOR en plantas.....	26
Figura 2.	Estructura de los carragenanos.....	28
Figura 3.	Plantas de <i>E. globulus</i> control y tratadas con OC kappa.....	31
Figura 4.	Incremento en altura y fotosíntesis neta en <i>E. globulus</i>	39
Figura 5.	Razón clorofila a/b en <i>E. globulus</i>	40
Figura 6.	Cantidad de glucosa en <i>E. globulus</i>	41
Figura 7.	Contenido de trehalosa en <i>E. globulus</i>	42
Figura 8.	Nivel de quinasa TOR en <i>E. globulus</i>	44
Figura 9.	Nivel relativo de transcritos en enzimas involucradas en la producción de glucosa en <i>E. globulus</i>	46
Figura 10.	Nivel relativo de transcritos en proteínas de fotosistemas y enzima de síntesis de clorofila en <i>E. globulus</i>	49
Figura 11.	Nivel relativo de transcritos de enzimas del metabolismo primario en <i>E. globulus</i>	52
Figura 12.	Nivel relativo de transcritos de enzimas del metabolismo secundario en <i>E. globulus</i>	53

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1.	Secuencia de los partidores usados para qRT-PCR.....	37
----------	--	----

DEDICATORIA

A Dios compañero inseparable de mi vida por todo lo recibido.

A mi querido esposo Willam y mis adoradas hijas Nashali y Haniset por su amor, comprensión, apoyo y por ser mi fuente de inspiración y motivación.

A mis queridos padres Maura y Edmundo por su amor, apoyo y comprensión en todas las etapas de mi vida y enseñarme el camino de la superación.

A mi hermano Alvaro por apoyo y comprensión en tiempos difíciles.

A mi querida abuelita Gudelia por todo el amor, apoyo y comprensión brindado durante toda mi vida, aunque ya no estas al final de esta etapa.

Esto es posible gracias a ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Deseo dejar constancia de mis sinceros agradecimientos a todas aquellas personas e instituciones que de una u otra manera contribuyeron en este proceso de formación académica:

A la Secretaria Nacional de Educación Superior Ciencia Tecnología e Innovación (SENESCYT)

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo A la Universidad Santiago de Chile

A la empresa Sirius Natura S.A conjuntamente con el Sr. Francisco Pérez y Jorge Yáñez

A mi tutora la Dra. Alejandra Moenne quien me dio la oportunidad de trabajar en su laboratorio y quien además ha sido un apoyo incondicional en este proceso de formación académica.

A mi amigo incondicional Alberto González por apañarme en los buenos y malos momentos en el ámbito académico como personal.

A Rodrigo Contreras por apoyarme en el desarrollo del trabajo de tesis y por siempre darme animo en mis peores momentos.

A Melisa Gómez por su amistad y apoyo en todos los momentos de este proceso.

A mis compañeros de laboratorio anteriores y actuales, Fabiola, Claudio, Daniel, Felipe, Axel y Antonio quienes de una u otra forma me apoyaron en este proceso.

A mi compañera de doctorado Marisol Pizarro por su apoyo y comprensión.

A mis amigos de siempre Mercedes Carranza, Fabricio Canchignia, Orly Cevallos, José Nieto Rodríguez, Nicolás Cruz Rosero, Jaime Morante Carriel por su apoyo en este proceso académico.

A mis nuevos amigos Carol, Fabio y Nidia personas que llegaron a mi vida para brindarme su amistad y apoyo incondicional.

A mis familiares y amigos quienes directa o indirectamente me impulsaron a seguir adelante y compartieron mis alegrías y tristezas.

A todos aquellos que de una u otra forma contribuyeron al feliz término esta etapa de formación académica.

A todos muchas gracias.

Introducción

1. *Eucalyptus globulus*

El género *Eucalyptus* pertenece a la familia *Mirtaceae* y consta con cerca de 700 especies que se encuentran distribuidas en todas las regiones tropicales y subtropicales. Los *Eucalyptus* forman densos bosques y existen más de veinte millones de hectáreas plantadas a nivel mundial. Además, *Eucalyptus* es una de las especies forestales de mayor interés comercial, debido a su rápido crecimiento y a la calidad de su madera.

Dada las excepcionales propiedades de su fibra, *Eucalyptus globulus* Labill es la principal especie para la producción de pulpa y papel en el mundo (Rojas *et al.* 2015).

Las primeras plantaciones comerciales de *Eucalyptus* fueron establecidas en Chile en el año 1885, siendo *E. globulus* la especie considerada como la más importante. A partir de 1990, comenzó el cultivo de otras especies tales como *E. nitens*, *E. delegatensis*, *E. viminalis* y *E. smithii* las cuales se establecieron en sitios no aptos para el crecimiento de *E. globulus*. En Chile, existen 563.813 hectáreas plantadas con *Eucalyptus* lo que representa un 23% del total de plantaciones exóticas en el país (Rojas *et al.* 2015).

Durante la segunda mitad del siglo XX, el Estado de Chile tomó un rol protagónico al realizar plantaciones e instalar industrias forestales en paralelo con algunos esfuerzos privados. Como resultado, las plantaciones se multiplicaron y se han convertido, junto a las industrias asociadas, en una importante actividad económica del país, exportando cerca de seis mil millones de dólares al año, además de las ventas nacionales (Grosse y Rosselot, 2016).

De ahí la relevancia en la investigación relacionada con la biotecnología forestal, ya que el compuesto natural oligo-carragenano kappa permite aumentar la velocidad de crecimiento y el rendimiento de celulosa.

2. La quinasa Target Of Rapamycin (TOR)

En la actualidad, se sabe que el crecimiento y desarrollo de células de mamíferos, nemátodos, levaduras, plantas y algas está controlado por la vía de señalización que incluye a la quinasa Target of Rapamycin (TOR), la cual pertenece a la familia de las fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K) (Xiong y Sheen, 2015; Rexin *et al.*, 2015; Dobrenel *et al.*, 2016a; Schepetilnikov y Ryabova 2018). En mamíferos, la quinasa TOR es inhibida

por concentraciones nanomolares del macrólido antifúngico rapamicina producido por la bacteria *Streptomyces hygroscopicus* (Crespo *et al.*, 2005; Wullschleger *et al.*, 2006). La rapamicina forma un complejo con la proteína FKBP12, una peptidil-prolil isomerasa, que se une a TOR y lo inhibe (Wullschleger *et al.*, 2006). Por el contrario, la quinasa TOR en plantas es débilmente inhibida por rapamicina (Ren *et al.*, 2011, Ren *et al.*, 2012). Además, se ha demostrado que cuando FKBP12 de planta se reemplaza por FKBP12 de humano o levadura, la quinasa TOR se vuelve sensible a la rapamicina en *Arabidopsis thaliana* (Sormani *et al.*, 2007; Xiong y Sheen 2012).

TOR es una serina/treonina proteína quinasa constituida por cinco dominios. En la región N-terminal, TOR presenta repeticiones del dominio HEAT (Huntingtin Elongation factor 3, subunidad A de la proteína fosfatasa 2, TOR1) constituidos por aproximadamente 40 aminoácidos que forman un par de α hélices antiparalelas que median interacciones proteína-proteína (Kunz *et al.*, 2000; Ren *et al.*, 2011). A continuación, se encuentra el dominio Focal Adhesión Target (FAT) (FRAP/ATM/TRRAP) constituido por aproximadamente 500 aminoácidos. Este dominio se presenta también en la familia de las quinasas relacionadas a PIK y su función es similar a la de las repeticiones HEAT (Bosotti *et al.*, 2000). Después, se encuentra el dominio FKBP12-Rapamycin Binding (FRB), sitio de interacción con el complejo FKBP12-rapamicina. Luego, se encuentra el dominio serina/treonina quinasa, el sitio activo, el cual contiene una señal de localización nuclear. Por último, en la región C-terminal se encuentra el dominio FAT carboxilo terminal (FATC) el cual está involucrado en la unión de TOR a membranas y es sensible al estrés oxidativo (Bakshi *et al.* 2017; Schemelzle y Hall, 2000). Una importante proteína asociada a la función de TOR es la

proteína Regulatory Associate Protein of Target of Rapamycin (RAPTOR) la cual interactúa con las repeticiones del dominio HEAT. Además, la proteína LST8 interactúa con el dominio quinasa y FRB C-terminal (Moreau *et al.*, 2012). En plantas de *Arabidopsis* se ha detectado otra proteína involucrada en la vía TOR, la proteína TAP46, la cual actúa como un inhibidor de la fosfatasa PP2A. Cuando TAP46 es sobreexpresada, los niveles de TOR y S6K fosforilado aumentan y las plantas presentan un fenotipo con mayor crecimiento. Por el contrario, al silenciar TAP46 la actividad de PP2A aumenta lo cual inactiva a TOR y S6K y las plantas presentan un fenotipo inviable (Ahn *et al.*, 2015).

La vía TOR está presente en todos los tejidos de *Arabidopsis*, en las raíces primarias y laterales, en los meristemas apicales de los brotes y en los meristemas florales. Hasta ahora, se han encontrado dos subunidades centrales de TORC1, RAPTOR y LST8 en *Arabidopsis*. Ambas proteínas están codificadas por dos genes, RAPTOR1/ RAPTOR2 y LST8-1/LST8-2, respectivamente. Sin embargo, no se ha logrado identificar un ortólogo RICTOR en genomas de plantas (Anderson *et al.*, 2005; Mahfouz *et al.*, 2006; Moreau *et al.*, 2012; Xiong and Sheen, 2014; Kravchenko *et al.*, 2015; Dobrenel *et al.*, 2016a; Salem *et al.*, 2018). RAPTOR1 se une al dominio HEAT, y LST8-1 al dominio FRB, tanto en *Arabidopsis* como en el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, lo que sugiere que es probable que ambas proteínas cumplan funciones similares a las de los ortólogos de mamíferos (Mahfouz *et al.*, 2006; Deprost *et al.*, 2007; Moreau *et al.*, 2012). En plantas sólo existe el complejo TORC1, el cual promueve el crecimiento y proliferación celular, mediante la modulación de la transcripción, la traducción, la biogénesis de los ribosomas, y el metabolismo primario y secundario (Zhang *et al.* 2013; De Vleeschauwer *et al.* 2018).

3. Vía de señalización de TOR en plantas

Se ha demostrado que la proteína TOR es conservada a nivel evolutivo y está involucrada en el control del crecimiento y la proliferación celular en plantas. En las plantas, TOR está codificado por un único gen que es esencial para el desarrollo post embrionario (Menand *et al.*, 2002). En plantas, TOR es una proteína de alrededor de 250 kDa que es 39% idéntica en secuencia aminoacídica a TOR

humano (Dobrenel *et al.*, 2016a; Schepetilnikov *et al.*, 2018). Además, los anticuerpos humanos anti-TOR-P Ser2448 reconocen TOR fosforilado en Ser2424 en *Arabidopsis* (Schepetilnikov *et al.*, 2013, Schepetilnikov *et al.*, 2017; Schepetilnikov y Ryabova, 2018).

Por otra parte, TOR es activado por el aumento de sacarosa, glucosa y fructosa en las plantas (Schluepmann *et al.*, 2004; Lunn *et al.*, 2006; Xiong y Sheen, 2013; Yadav *et al.*, 2014) ya que la sacarosa y glucosa se convierten rápidamente en glucosa -6-P (G6P), glucosa-1-P (G1P) y en trehalosa 6-P (Yadav *et al.*, 2014). Cabe mencionar la T6-P es un intermediario en la síntesis de trehalosa por lo que un aumento en el nivel de T6P refleja un aumento de trehalosa, y viceversa (Li *et al.*, 2011). Se ha determinado que G1P, G6P y T6P, así como ribosa 6P, inhiben directamente a la quinasa SnRK1 (Zhang *et al.*, 2009; Schluepmann *et al.*, 2012; Piattoni *et al.*, 2011; Nunes *et al.*, 2013a) la cual fosforila a RAPTOR e induce la liberación de RATOR del complejo TOR, inactivándolo (Nukarinen *et al.*, 2016). Por lo tanto, el aumento de sacarosa o glucosa conducen al aumento de G1P, G6P y T6P lo cual inhibe directamente a snRK1 lo que redundo en la activación del complejo TOR. Interesantemente, los niveles bajos de T6P estimulan el crecimiento y los niveles altos lo inhiben (Schluepmann *et al.*, 2004; Schluepmann *et al.*, 2012).

Se ha demostrado que el complejo TOR/RAPTOR/LST8 regula una amplia gama de procesos biológicos en plantas y que la inhibición de TOR disminuye la producción de polisomas y la reiniciación de la traducción (Xiong y Sheen, 2014; Rexin *et al.* 2015; Dobrenel *et al.*, 2016b; Schepetilnikov *et al.*, 2011 y Schepetilnikov *et al.*, 2013). Además, se ha visto que la proteína TOR está involucrada en el control del crecimiento y la proliferación celular en plantas (John *et al.* 2011). La mayoría de los componentes de esta vía, como TOR, RAPTOR, LST8, FKBP12, S6K1 y S6K2 se han identificado en *Arabidopsis* y en maíz. También, se han reportado ortólogos de proteínas RAPTOR y S6K (John *et al.*, 2011). Otro miembro de esta vía es la proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCP), proteína similar a Mei2 y la subunidad Tap46 de la fosfatasa PP2A, la cual también se ha detectado en plantas (Rexin *et al.*, 2015). Los homólogos más cercanos a TOR de *Arabidopsis* son las proteínas TOR de *Populus trichocarpa* (identidad: 82%, similitud: 89%) y la isoforma de proteína

TOR1 de *Vitis vinifera* (identidad: 80%, similitud: 88%) (Agredano-Moreno *et al.*, 2007; John *et al.*, 2011). El árbol filogenético de las proteínas TOR de diferentes especies refleja perfectamente las relaciones filogenéticas entre especies (John *et al.*, 2011).

3.1. Regulación de TOR en plantas

Algunos componentes reguladores río arriba de la vía TOR en animales no existen en plantas por lo que es probable que las plantas dependan de mecanismos de señalización específicos que involucran hormonas de crecimiento (Van Dam *et al.* 2011; Ljung *et al.* 2015; Ruan 2014). Además, estudios han demostrado que la glucosa induce la actividad TOR en plantas a los cuatro días post-germinación y que esta vía es necesaria en plantas jóvenes y regula expresión génica (Xiong *et al.* 2013 y Xiong y Sheen, 2012). TOR se expresa altamente en embriones y endospermo y la inhibición de TOR resulta en detención del crecimiento en *Arabidopsis* (Menand *et al.*, 2002). Del mismo modo, la supresión de RAPTOR o LST8 dio lugar a retrasos en el crecimiento vegetativo en *Arabidopsis* (Zhang *et al.* 2013).

Aunque TORC1 es sensible a la rapamicina en mamíferos y levaduras, las primeras investigaciones indicaron que las plantas eran insensibles a la rapamicina, y que el dominio de unión FKBP-rapamicina (FRB) de *Arabidopsis* no formó un complejo con rapamicina en un ensayo de dos híbridos de levadura in vitro. Sin embargo, ensayos más sensibles a través de una interacción de proteína-luciferasa mostraron que FKBP12 humana interacciona con el dominio FRB de TOR de *Arabidopsis*. Además, también se ha observado que plántulas de *Arabidopsis* en cultivo hidropónico tratadas con rapamicina muestran una rápida y efectiva inhibición de la actividad TOR ya que se observa fosforilación de la T449 en S6K1, e inhibición del crecimiento de cotiledones, hojas verdaderas, pecíolos, raíces primarias y secundarias (Baena-González *et al.*, 2007; Xiong y Sheen, 2012; Xiong *et al.*, 2013; Deng *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017).

Además, TOR es un importante regulador de la vía de señalización en auxinas y conecta las vías hormonales y de nutrientes (Henriques *et al.*, 2014). También, se ha demostrado que auxinas activan el complejo de detección de auxina

ABP1-TMK ubicado en la membrana celular lo cual, a su vez, activa la GTPasa ROP2 que es homóloga a Rheb de animales (Xu *et al.*, 2014). La activación de ROP2 conduce a la activación de TOR lo que a su vez activa a la quinasa s6K y esto activa la traducción (Schepetilnikov *et al.*, 2017). Asimismo, se ha demostrado que la activación de la vía TOR en *Arabidopsis* aumenta la expresión de genes que codifican enzimas implicadas en reacciones anabólicas tales como la síntesis de aminoácidos, ARN, ADN y pared celular, así como de enzimas de la vía glicolítica, ciclo de Krebs y las proteínas de la cadena transportadora de electrones mitocondrial (Xiong *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2012; Caldana *et al.*, 2013).

Aunque la vía de plantas ha sido menos estudiada que en animales, se sabe que ésta es activada por señales ambientales, nutrientes, estrés, por la insulina y un factor de crecimiento tipo insulina (IGF), el cual es un péptido de 5.7 KDa (John *et al.* 2011; Dobrenel *et al.* 2011; Rodríguez-López *et al.* 2011). De hecho, la insulina y el péptido IGF aumentaron el crecimiento de callos de maíz, así como la división celular y la síntesis de la proteína ribosomal S6 mediante la movilización del transcrito de S6 en los polisomas (Garrocho-Villegas *et al.* 2013). Además, se observó un aumento de la fosforilación de TOR y S6K en respuesta insulina y al péptido IGF, así como una inhibición de la fosforilación en respuesta a rapamicina. Además, se identificó un receptor en maíz que une insulina y el péptido IGF (Garrocho-Villegas *et al.* 2013).

3.2. Activación y represión de señalización de TOR

La proteína quinasa TOR integra señales extracelulares tales como hormonas, factores de crecimiento, estrés biótico y abiótico junto con la disponibilidad de nutrientes intracelulares y el estado energético para controlar la síntesis de proteínas y otros procesos anabólicos si las condiciones son favorables, y reprime los procesos catabólicos como la autofagia (Albert y Hall, 2015; Schepetilnikov y Ryabova, 2018). Estudios recientes han demostrado nuevos vínculos para la reiniciación traduccional regulada por TOR de ARNms específicos estimulados por auxina e infección viral (Schepetilnikov *et al.* 2011; y Schepetilnikov *et al.* 2013).

3.3. Señalización glucosa-TOR

En las plantas, la glucosa derivada de la fotosíntesis es un nutriente importante para el desarrollo de éstas (Li y Sheen, 2016; Xiong *et al.*, 2013). La señalización de glucosa- TOR aumenta la transcripción de genes involucrados en el metabolismo primario y secundario y el ciclo celular (Xiong *et al.*, 2013). Además, se ha demostrado que TOR transduce las señales de energía de la glucosa derivadas de la fotosíntesis específicamente para controlar la proliferación de células madre en el meristema de la raíz (Li *et al.*, 2017). TOR fosforila directamente y activa el factor de transcripción E2Fa activando la división celular en el meristema de la raíz. La fosforilación específica de E2Fa por la quinasa TOR quinasa proporcionó un ejemplo de cómo la señalización de glucosa-TOR controla la transcripción de los genes de la fase S para promover la activación del meristema de la raíz (Xiong *et al.*, 2013; Xiong y Sheen, 2013). También se ha demostrado que la activación de la división celular en los brotes apicales requiere señales de glucosa y luz, pero el meristema de la raíz sólo requiere la señalización de la energía de la glucosa. Estos hallazgos sugieren que la quinasa TOR desempeña un papel esencial en la división celular y crecimiento de la raíz (Li *et al.*, 2017 y Xiong y Sheen, 2013).

La activación de TOR también puede ocurrir indirectamente a través de la inactivación de la proteína quinasa SnRK1 sensor de glucosa/energía; mecanismo que representa otro nodo conservado evolutivamente para integrar respuestas a nutrientes, energía y estrés en plantas (Baena-González *et al.*, 2007; Broeckx *et al.*, 2016; Herzig y Shaw, 2018; Li y Sheen, 2016; Wurzinger *et al.*, 2018). En *Arabidopsis*, KIN10 y KIN11 codifican las subunidades catalíticas del complejo heterotrimérico SnRK1 el cual es directamente inhibido por la G1P, G6P, T6P y se activa por inanición, falta de energía y estrés abiótico (Baena-González *et al.*, 2007). Interesantemente, hallazgos recientes han revelado un papel crucial para la señalización de glucosa-TOR en el ápice del brote mediado por los fitocromos, fotorreceptores de luz roja, y los criptocromos, fotorreceptores de luz azul, ya que la luz activa los genes de síntesis de auxinas y ROP2 para permitir la señalización de TOR por glucosa durante la proliferación de los primordios foliares. Sin embargo, en el meristema de la raíz, la presencia de luz en la síntesis de auxinas no es necesaria para promover la señalización de la glu-

cosa-TOR en la activación del ciclo celular (Xiong *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2017). Además, se ha demostrado que la señalización por glucosa a través de TOR controla la acumulación del factor de transcripción BZR1 que promueve la transcripción de genes relacionados con el crecimiento (Oh *et al.*, 2012; Bai *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014). Experimentos en *Arabidopsis* demostraron que la inanición y la inhibición de TOR por RNAi conduce a la detención del crecimiento, promueve la degradación de BZR1 y la autofagia (Zhang *et al.*, 2016). En cambio, la glucosa aplicada de manera exógena promueve la acumulación de BZR1 y el crecimiento de las plántulas. Estos resultados indican que TOR puede mediar en la señalización por BR y la activación del crecimiento (Zhang *et al.*, 2016).

3.4. Señalización nutrientes-TOR

Además de la glucosa, otros nutrientes han demostrado ser importantes reguladores de la señalización de TOR en plantas y animales. En células de mamíferos han sido ampliamente estudiados los aminoácidos esenciales a través de diferentes sensores que convergen en la activación de la GTPasa Rag. Sin embargo, las plantas carecen de equivalentes de estos sensores de aminoácidos, aunque se sabe que los nutrientes como el nitrógeno (N), el fosfato (Pi) y el azufre (S) desempeñan un papel crucial en la activación de la vía TOR (Dong *et al.*, 2017). Un estudio reciente mostró que la disponibilidad de S coordina la señalización de glucosa para activar a TOR y que la quinasa GCN2 actúa como un sensor de la disponibilidad de C/N (Dong *et al.*, 2017).

Además, el nitrato es la principal fuente de N y actúa como una señal para promover el crecimiento de brotes en todo el sistema y el establecimiento de raíces en *Arabidopsis* (Liu *et al.*, 2017). Los aminoácidos también activan la señalización TOR y la fosforilación de S6K (Xiong y Sheen, 2015). Estudios genéticos y fisiológicos, y el análisis de metabolitos en líneas inhibidas de TOR, revelaron que TOR regula el desarrollo y la vida útil en *Arabidopsis* mediante la regulación del crecimiento celular, el metabolismo del carbono y el nitrógeno, la expresión de genes y la síntesis de ARNr y proteínas. Además, la inhibición de la vía TOR utilizando el inhibidor AZD8055 disminuye la cantidad de transcritos de proteínas involucradas en fotosíntesis, síntesis de clorofila y asi-

milación de C (Montané y Menand 2013; Dong *et al.*, 2015). Esto indica que la activación de la vía TOR conduce al aumento de la fotosíntesis y el metabolismo basal. Además, la activación de la vía TOR regula negativamente la expresión de genes que codifican enzimas catabólicas implicadas en la síntesis de proteínas, aminoácidos, lípidos, degradación del almidón, la autofagia y el ciclo del glioxilato (Xiong *et al.*, 2013).

Asimismo, la activación de la vía TOR aumentó la expresión de genes que codifican enzimas implicadas en el metabolismo secundario y respuestas de defensa (Caldana *et al.*, 2013). De forma similar, la vía TOR interviene en el aumento del nivel de compuestos fenilpropanoides (PPCs) en *A. thaliana* (Caldana *et al.*, 2013).

3.5. Señalización fitohormonas-TOR

Varias fitohormonas, como el ácido jasmónico, el ácido abscísico, el ácido salicílico, los brasinoesteroides y las citoquininas, intervienen en la señalización cruzada de la vía TOR (Dong *et al.*, 2015; Kravchenko *et al.*, 2015; Pfeiffer *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016; De Vleeschauwer *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2017). Se sabe que las hormonas de crecimiento más sensibles, la auxina y la kinetina, promueven la fosforilación de S6K en cultivos de suspensión celular, lo que conduce a la fosforilación de la proteína ribosomal S6. Además, en estudios recientes se ha mostrado que las auxinas intervienen como una molécula efectora que actúa sobre TOR a través de la activación de una pequeña GTPasa, ROP2 (Xu *et al.*, 2010; Schepetilnikov *et al.*, 2017). Estudios sobre el mecanismo de activación de TOR por ROP2 condujeron al descubrimiento de que ROP2 se une físicamente a TOR y promueve su activación, si está unido a GTP (Schepetilnikov *et al.*, 2017). En respuesta a ROP2, TOR se asocia con estructuras similares a endosomas, lo que sugiere que los endosomas de las plantas sirven como un centro para la activación de TOR en la percepción de la señal de auxina. Por lo tanto, la GTPasa ROP2 representa el único ejemplo de efector activador directo de TOR en plantas. En contraste, se ha determinado que la hormona del estrés vegetal ácido abscísico (ABA) reprime la señalización TOR mediante la activación de SnRK2 la cual fosforila a RAPTOR1 para disociarlo de AtTORC1 (Wang *et al.*, 2018). Esto a su vez

mejora la señalización del receptor ABA-PYL en respuestas a estrés reduciendo la fosforilación de TOR e inhibiendo los receptores ABA (Wang *et al.*, 2018). Por lo tanto, la señalización de TOR reprime la señalización ABA y las respuestas en condiciones sin estrés, mientras que la señalización ABA reprime la señalización TOR y el crecimiento durante el estrés.

Las plantas utilizan este mecanismo de retroalimentación fosforegulador conservado para optimizar el equilibrio del crecimiento y las respuestas al estrés (Wang *et al.*, 2018). Además, es importante destacar que la supresión de TOR por AZD resultó en la remodelación del perfil de expresión de los genes asociados con la fotosíntesis y varias fitohormonas, identificándose un total de 94 DEG (59 genes regulados por aumento y 35 genes regulados por disminución) involucrados en las ocho vías de transducción de señales de fitohormonas, lo que indica que TOR juega un papel crucial en la modulación de la fotosíntesis y la señalización de fitohormonas en *Arabidopsis* (Dong *et al.*, 2015).

3.6. TOR y ciclo circadiano

En presencia de luz, la fotosíntesis proporciona energía y carbono (C) para el crecimiento, mientras que, durante la noche, el metabolismo y el crecimiento dependen de las reservas de C que se acumulan en los períodos de luz (Zeeman *et al.*, 2010). La importancia de este sistema de ritmo circadiano está sustentada por los hallazgos de que los defectos en el reloj causan la desregulación metabólica y dan como resultado trastornos metabólicos en animales (Zheng y Seghal *et al.*, 2010).

Recientemente, se demostró que el reloj regula la hidrólisis del almidón en plantas (Graf *et al.*, 2010). Es así que, para determinar la contribución del reloj y la señalización de la luz a la regulación diurna del crecimiento en *A. thaliana* se han realizado estudios sobre plantas mutantes con fotoperiodo corto (*lhyccal*) y con fotoperiodo largo (*pr7pr9*). Se observó que el crecimiento tenía una oscilación circadiana, en donde los mutantes de día corto mostraron activación del crecimiento a horas tempranas, mientras que los mutantes de día largo mostraron un aumento del crecimiento a horas más tardías de día (Apelt *et al.*, 2019).

Esta variación del ritmo de crecimiento se explicaría en parte porque la obtención de energía mediante la degradación del almidón se activa durante la noche y se inactiva durante el día de acuerdo a la acumulación de las proteínas regulatorias LHY/CCA1 y PRR7/9 (Graf *et al.*, (2010). En consecuencia, las oscilaciones rítmicas de los genes regulatorios del reloj circadiano muestran una conexión con la regulación de la traducción de los genes relacionados al crecimiento (Schepetilnikov *et al.*, 2018).

Recientemente, se ha logrado identificar que el factor de transcripción BASIC LEUCINE ZIPPER63 (bZIP63) regula la expresión del gen del oscilador circadiano PSEUDORESPONSE REGULATOR7 (PRR7) para cambiar la fase circadiana en respuesta a los azúcares (Frank *et al.*, 2018). También se demostró que la quinasa SnRK1, la cual se activa cuando baja la sacarosa, glucosa o trehalosa 6-P, fosforila y activa a bZIP63 y el período circadiano el cual a su vez aumenta transcripción de PRR7 (Mair *et al.*, 2015; Nukarinen *et al.*, 2016). Además, la TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE1 (TPS1), que sintetiza el azúcar de señalización trehalose-6-phosphate, es requerida para la respuesta a la sacarosa (Frank *et al.*, 2018). Por lo tanto, los ritmos diarios de disponibilidad de azúcares regulan al oscilador circadiano a través de la acción de bZIP63, TPS1 y la subunidad KIN10 de snRK1 de lo cual permite explicar el mecanismo molecular mediante el cual se coordina el oscilador circadiano con la disponibilidad de azúcares (Frank *et al.*, 2018).

3.7. TOR y cambios epigenéticos

Las condiciones ambientales pueden cambiar de manera transitoria o permanente la expresión de los genes mediante cambios epigenéticos que ocurren en la cromatina en animales y plantas. Esto proporciona una estrategia para que los organismos se adapten al cambio ambiental. Los cambios epigenéticos no modifican la secuencia de ADN y muchas veces estos cambios son guiados mediante pequeños ARN o ARN más largos no codificantes que indican el sitio donde ocurrirá la modificación de la cromatina que llevan a una disminución o aumento de la transcripción (Meyer 2015). Estos RNAs guía también pueden reconocer la secuencia de un promotor y mediar la metilación de las citosinas. En *Arabidopsis*, la metilación de la citosina se produce en tres contextos de

secuencia, CG, CHG y CHH mediada por metiltransferasas de ADN (Meyer 2015, Pikard, 2014). Las marcas de metilación más prominentes se encuentran en los sitios CG, donde se propagan por el ADN mediante la METHYLTRANSFERASE1 (MET1), un homólogo vegetal de la metiltransferasa 1 de mamíferos (Dnmt1). La metilación de la citosina no simétrica en un contexto de CHH (H que representa C, T o A) está controlada en gran medida por la vía de la metilación del ADN dirigida por pequeños ARN de 24 nt los cuales actúan como guías para los DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2 (DRM2). Existe, además, una tercera metiltransferasa de ADN, CHROMOMETHYLASE3 (CMT3), que se encuentra exclusivamente en plantas la cual controla predominantemente la metilación de CHG (Jackson *et al.*, 2002) en combinación con metilación de histonas (Cao *et al.*, 2003).

Cabe indicar que para determinar si la señalización TOR participa en la regulación de los genes ARNr por posibles cambios epigenéticos. Se realizaron estudios en plantas de Arabidopsis los que revelaron que la proteína ribosomal RPS6, ubicada río abajo en la vía TOR, puede interactuar directamente con la histona desacetilasa 2B (AtHD2B) que pertenece a la familia de la histona deacetilasa HD2 específicas de plantas (Kim, 2014). Esto se observó al co-exresar RPS6 y AtHD2B cuando ambas proteínas se co-localizaron en el nucléolo y, mediante ensayos de ChIP se determinó que RPS6 interactúa directamente con el promotor de ARNr. En ensayos de silenciamiento de RPS6 y AtHD2B se observó la disminución de la expresión de proteínas ribosomales, así como un menor desarrollo de las plantas de Arabidopsis (Kim, 2014). Por lo tanto, AtHD2B al activarse gracias a RPS6 puede participar en la remodelación de la cromatina para promover la biogénesis ribosomal.

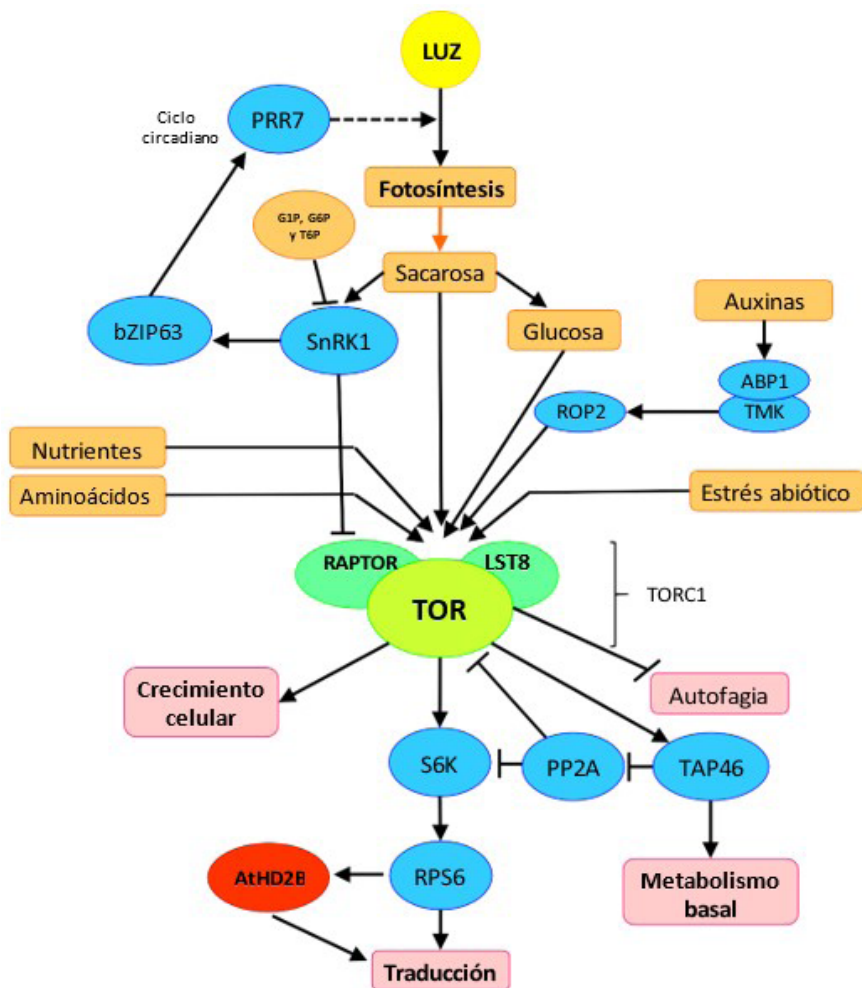


Fig. 1. Vía de señalización TOR en plantas. El complejo TOR es activado por vías metabólicas y señales medioambientales en organismos fotosintéticos.

4. Estimulación del crecimiento en plantas mediada por elicitores

Los elicitores en plantas son moléculas que estimulan variadas respuestas de crecimiento y defensa en las plantas. En estos últimos años, los estudios se han centrado en los mecanismos de percepción y transducción de las señales, en particular la identificación de los receptores que unen estos elicitores y las vías de transducción de las señales. Recientemente se ha determinado que fucoidanos y alginatos, polisacáridos sulfatados y carboxilados, respectivamente, obtenidos de algas pardas son reconocidos por el receptor Toll-like Receptor 4 (TLR4) en células de mamífero. Se observó que los fucoidanos promovieron la apoptosis de células cancerígenas en ratón (Hsu, *et al.*, 2017) y que la fracción gulurónica de los alginatos estimula la proliferación de macrófagos por activación de la vía TLR4/Akt/mTOR en ratón (Fang *et al.*, 2017). Las lectinas son fundamentales para la vida de las plantas y tienen importantes funciones en la comunicación entre células; en el desarrollo y defensa de las plantas. Estos receptores pueden estar solubles en el citoplasma o pueden estar asociadas a la membrana con un dominio de receptor extracelular y un dominio intracelular tipo quinasa, entre estos podemos encontrar los de tipo G, tipo L, dominios LysM que se pueden unir a diversos azúcares. Los de tipo G se unen a galactósidos y también se encuentran en animales y se llaman galectinas. Estas galectinas al unirse al ligando son endocitados y los de tipo L están asociados a la vía de señalización fosfatidilinositol quinasa (PIK) (Bellande *et al.*, 2017).

4.1 Regulación del crecimiento de plantas mediada por oligosacáridos de algas marinas

Inicialmente se observó que oligo-alginatos obtenidos por depolimerización de alginatos de la pared de un alga marina parda (Poly-Ma) y de galactanos sulfatados de la pared de un alga marina roja (Poly-Ga) estimulan el crecimiento en altura y aumentan la biomasa foliar en plantas de tabaco (var Xanti) y protegen contra la infección por Virus del Mosaico de Tabaco (TMV) (Laporte *et al.*, 2007). Asimismo, los carragenanos son los componentes principales de la pared celular de las algas marinas rojas y están constituidos por residuos de galactosa sulfatada y en algunos casos residuos de anhidrogallactosa. El carragenano kappa posee un grupo sulfato por cada disacárido y un residuo de anhidrogallac-

tosa, el carragenano lambda posee tres grupos sulfato por cada disacárido y el carragenano iota posee dos grupos sulfato por cada disacárido y un residuo de anhidrogalactosa. Por lo tanto, el grado de sulfatación aumenta en los carragenanos, kappa, iota y lambda y sólo los carragenanos kappa y iota tienen residuos de anhidrogalactosa (Fig. 3) (Vera *et al.*, 2011).

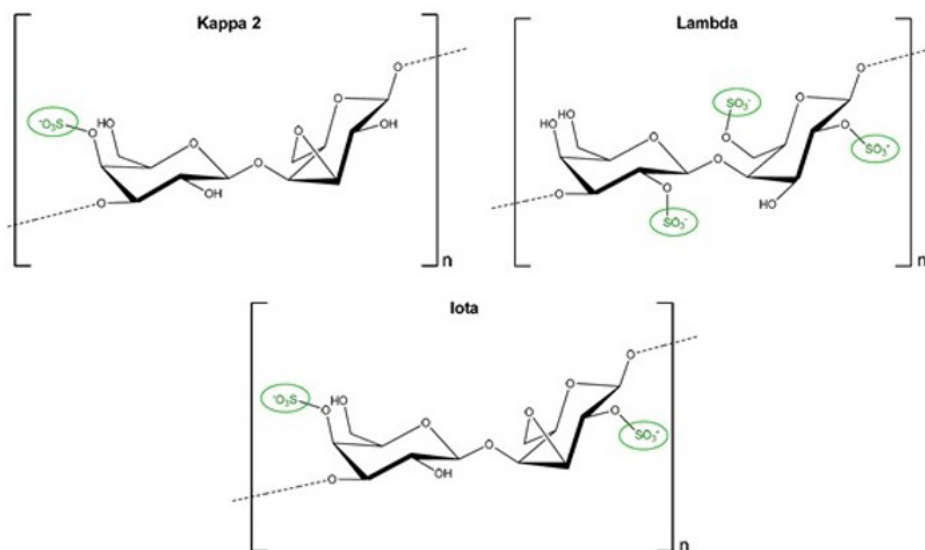


Fig. 2. Estructura de los carragenanos

Inicialmente, se demostró que los oligo-carragenanos (OCs) kappa, lambda y iota con grado de polimerización de 1-3, 3-9 y 2-6, respectivamente, estimulaban la embriogénesis de microesporas de brócoli (Lemmonier-Le Penhuizic *et al.*, 2001). Luego, se observó que el oligo-carragenano kappa depolimerizado con radiación indujo un aumento en el crecimiento de tallos y raíces en plantas de arroz (Abad *et al.*, 2004). Luego, se observó que una solución acuosa de los OCs kappa, lambda y iota a una concentración de 0.5 a 5 mg mL⁻¹ asperjados sobre hojas de plantas de tabaco (*var. Xhanti*) aumentaron el crecimiento en altura y la biomasa foliar (Moenne, 2016). Cabe mencionar que los carragenanos kappa, lambda y iota sin depolimerizar, a una concentración micromolar equivalente a la utilizada para los OCs, no estimulan el crecimiento en tabaco

indicando que el proceso de depolimerización es indispensable para el fenómeno de estimulación del crecimiento en plantas (Moenne, resultados no publicados). Luego, se determinó que los OCs kappa, lambda y iota a una concentración de 1 mg mL^{-1} aplicados sobre las hojas de plantas de tabaco comercial (*var. Burley*) estimularon el crecimiento y biomasa por aumento en la fotosíntesis neta, el metabolismo basal y la división celular, principalmente OC kappa y iota (Castro *et al.*, 2012). Adicionalmente, el tratamiento con OC kappa, lambda y iota aumentó la protección contra la infección por virus del mosaico del tabaco (TMV), la bacteria *Pectobacterium carotovorum* y el hongo *Botrytis cinerea* en plantas de tabaco (*var. Xanthi*) lo cual se correlacionó con el aumento de compuestos fenólicos con potencial actividad antimicrobiana debido a la activación de la ruta fenilpropanoide (Vera *et al.*, 2012).

Por otra parte, los OCs kappa, lambda e iota aplicados a una concentración de 1 mg mL^{-1} , una vez a la semana, cuatro veces en total, aumentaron la altura, el diámetro del tronco, la fotosíntesis neta y los niveles de compuestos fenilpropanoides totales y aceites esenciales en *Eucalyptus globulus* cultivado en el campo durante tres años (González *et al.*, 2013b). Además, se demostró que OC kappa media un aumento en la síntesis de compuestos reductores tales como NADPH, ascorbato (ASC) y glutatión (GSH), así como también en las actividades de tiorredoxina reductasas (TRR) y tiorredoxinas (TRX) en *E. globulus* cultivados durante cuatro meses al aire libre (González *et al.*, 2014a). Asimismo, la activación de TRR y TRX aumentó la actividad de las enzimas relacionadas con el metabolismo basal, la asimilación de C, N y S, la síntesis de purinas y pirimidinas, y las actividades de las enzimas del ciclo de Krebs (González *et al.*, 2014a).

Adicionalmente, OC kappa aumentó el nivel de hormonas promotoras del crecimiento como auxinas, giberelinas y citoquininas en árboles de *E. globulus* (González *et al.*, 2014b) así como en *Pinus radiata* (Saucedo *et al.*, 2015). Por último, OC kappa aumentó la cantidad de terpenos volátiles y nuevos terpenos con potencial actividad antipatogénica en *E. globulus* (González *et al.*, 2014c) lo cual sugiere que la defensa contra patógenos es también estimulada por OC kappa.

El aumento de fotosíntesis neta y de la actividad de las enzimas del metabolismo primario y secundario en *E. globulus* podría deberse a un aumento en la expresión de los genes que codifican para proteínas y enzimas involucradas en estos procesos. Esto podría estar dado por un aumento inicial de la glucosa y trehalosa lo cual inhibiría a SnRK1 activando la vía TOR (aumento de TOR-P) lo cual llevaría al aumento de la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en la fotosíntesis y enzimas del metabolismo basal, lo cual estimularía en el crecimiento de *E. globulus*.

HIPÓTESIS

El oligo-carragenano kappa estimula el crecimiento de *Eucalyptus globulus* por aumento de los niveles de glucosa y trehalosa y TOR-P lo cual conduce a un aumento de la expresión de genes de proteínas involucradas en la fotosíntesis y de enzimas del metabolismo primario y secundario.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si el oligo-carragenano kappa aumenta la cantidad de glucosa, trehalosa y TOR-P lo cual llevaría a un aumento de la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en la fotosíntesis y enzimas en el metabolismo primario y secundario en *Eucalyptus globulus*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar el efecto de OC kappa sobre el crecimiento, la fotosíntesis neta y el contenido de glucosa y trehalosa en *E. globulus*.
2. Determinar si OC kappa aumenta el nivel de TOR-P en *E. globulus*.
3. Determinar si el efecto de OC kappa aumenta la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en la fotosíntesis y enzimas del metabolismo primario (asimilación de C, N y S) y secundario (síntesis de terpenos y compuestos fenilpropanoides) en *E. globulus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo y tratamiento de plantas de *Eucalyptus* con OC Kappa

Las plantas de *E. globulus* fueron obtenidas a partir de semillas producidas por Semillas Imperial S.A. (Los Ángeles, Chile). Las plantas tenían inicialmente una altura de aprox. 30 cm y fueron cultivadas al aire libre en bolsas de plástico con tierra de hoja (compost) y regadas día por medio. El grupo control (n=10) fue asperjado sobre las hojas sólo con agua (5 mL por planta) y el grupo tratado (n=10) fue asperjado con OC kappa 1 mg mL^{-1} (5 mL por planta), una vez por semana, cuatro veces en total. Las plantas fueron cultivadas por 4 meses (16 semanas) sin tratamiento adicional. Se obtuvieron hojas (parte media) de los 10 árboles control y tratados (10 g), cada semana, un día después de cada tratamiento, y hasta 4 meses post-tratamiento. Las hojas recolectadas fueron divididas en tres muestras de 3.3 g y congeladas a -80°C para análisis posteriores.

2. Medición de la altura de las plantas

La altura de las plantas control y tratadas fue determinada cada semana, un día después de cada tratamiento y hasta los 4 meses post tratamiento utilizando una cinta métrica, midiendo desde la base hasta el ápice de las plantas.

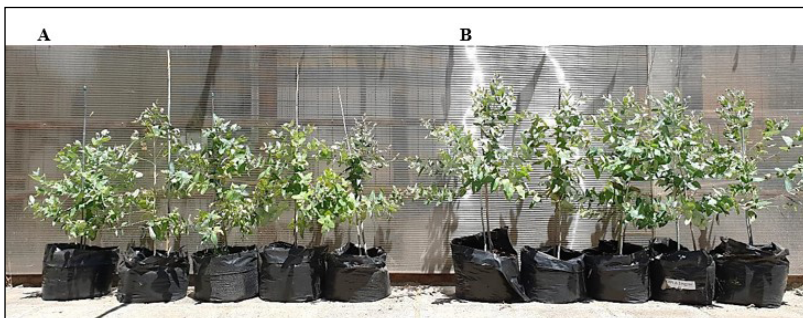


Fig. 3. Plantas de *E. globulus* control (A) y tratadas con OC kappa (B) a la semana 12 de cultivo

3. Cuantificación de la fotosíntesis

La fotosíntesis neta se determinó en hojas situadas en la parte media de cada planta control y tratadas de *E. globulus* usando un analizador portátil de gases al infrarrojo Ciras-1 (PPSSystems, Hitchin, Reino Unido) premunida de una pinza detectora de 12,5 cm². Se utilizó una fuente de luz LED roja/blanca, una irradiación de 1000 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de luz fotosintéticamente activa (PAR), una concentración de CO₂ de 500 ppm y una humedad relativa del 70% a 24°C durante 1 min. Las mediciones fueron realizadas en cinco hojas de cada planta ubicadas en la parte media de cada árbol control y tratado, a las 10 de la mañana.

4. Cuantificación de la clorofila a y b

La cuantificación de la clorofila a y b se realizó como se describe en (Lichtenhaler & Wellburn, 1983). Las hojas de las muestras control y tratadas (cada una de 0,1 g) fueron homogenizadas utilizando nitrógeno líquido y un mortero de porcelana con ayuda de un pistilo, en triplicado. Se agregó 1 mL de acetona y se incubó a 4°C durante 90 minutos. La mezcla se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 min utilizando una microcentrífuga y se recuperó el sobrenadante. Se tomó una alícuota de 0,1 mL de extracto y se diluyó con 0,9 mL de acetona. Se determinó la absorbancia a 665 y 649 nm correspondiente a la clorofila a y b, respectivamente, utilizando un espectrofotómetro Hewlett Packard/Agilent Cary modelo 8453 UV-VIS (Santa Clara, CA, EE.UU.). La concentración de clorofila a y b se calculó utilizando la fórmula:

$$\begin{aligned} \text{Clorofila a } (\mu\text{g mL}^{-1}) &= 13,96 A_{665} - 6,88 A_{649} \\ \text{Clorofila b } (\mu\text{g mL}^{-1}) &= 24,96 A_{649} - 7,32 A_{665} \end{aligned}$$

5. Cuantificación de glucosa

La cuantificación de glucosa se realizó con hojas (0,1 g) que fueron congeladas con nitrógeno líquido y homogenizadas en un mortero de porcelana con ayuda de un pistilo. Se agregaron 0,5 mL de agua destilada y se continuó con la homogenización. La mezcla se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 min y se recuperó el sobrenadante. Una alícuota de 30 μL del sobrenadante fue agregada a 500

μl de mezcla de reacción de glucosa oxidasa/peroxidasa (Valtek Diagnostics, Santiago, Chile) y se incubó por 5 min. Se determinó la absorbancia a 505 nm y se calculó la concentración utilizando una curva de calibración preparada con glucosa en concentraciones de 0,2 y 2 mg mL⁻¹.

6. Cuantificación de trehalosa

La cuantificación de trehalosa se realizó como se describe en Ahmed *et al.*, (2013) y Zuñiga *et al.*, (2016). Las hojas (0,1 g) fueron congeladas con nitrógeno líquido y homogenizadas en un mortero de porcelana con ayuda de un pistilo. Se agregaron 2 mL de etanol y se continuó con la homogenización. La mezcla se calentó a 100°C por 1 h y se evaporó el etanol a 60 °C. Se agregaron 5 mL de ácido sulfúrico 5 mM y se homogenizó el residuo en un mortero. La mezcla se centrifugó a 3.200 rpm durante 10 min y se recuperó el sobrenadante. El sobrenadante se filtró a través de filtros de PDVF de poro de 0,2 μm y el filtrado se calentó a 100 °C durante 1 h (para hidrolizar sacarosa) y se enfrió la solución en hielo. Una vez frío, el pH se neutralizó con hidróxido de sodio 100 mM, se evaporó el solvente y el residuo se disolvió en agua destilada.

La cuantificación de trehalosa se realizó inyectando un volumen de 20 μL por muestra en un cromatógrafo Agilent 1100 equipado con una columna Sugar-pak I de 300 mm x 6.5 mm (Waters Corp., Massachusetts, USA) a una temperatura de 75 °C acoplada a un detector de índice de refracción de la serie Agilent 1100 a una temperatura de 55 °C. El programa de elución isocrática constó de 40 min de una fase móvil de 0,1% de EDTA- calcio, con un flujo de 0,35 mL min⁻¹ a una presión de 38 bares. La curva de calibración se preparó utilizando trehalosa con concentraciones de 0 a 5 mg mL⁻¹.

7. Preparación de extractos proteicos

Los extractos de proteínas fueron preparados como se describe en Faurobert *et al.*, (2007). Las hojas (1 g) fueron congeladas con nitrógeno líquido y pulverizadas en un mortero de porcelana con la ayuda de un pistilo. Se agregaron 3 mL de tampón de extracción (Tris-HCl 0,5 M, sacarosa 0,7 M, PMSF 1 mM, EDTA 50 mM, KCl 0,1 M y β - mercaptoetanol 0,2% pH 8,0) y se continuó con la homogenización hasta que la mezcla se descongeló. Se agregó 1 mL de fenol saturado con Tris pH 8,0 y la mezcla se homogenizó en hielo durante 10 min. La mezcla se centrifugó a 3.200 rpm durante 10 min a 4 °C, se recuperó la fase orgánica y se mezcló con 4 volúmenes de acetato de amonio 0,1 M solubilizado en metanol. La mezcla se agitó utilizando un vórtex y se incubó durante la noche a -20 °C para obtener la precipitación de proteínas. La mezcla se centrifugó a 3.200 rpm durante 15 min a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. El precipitado de proteína se lavó dos veces con acetato de amonio en 0,1 M en metanol y luego se lavó una vez con acetato de amino en 0,1 M acetona. Las proteínas precipitadas fueron secadas a temperatura ambiente y fueron solubilizadas en Tris-HCl 50 mM pH 8,0. Se cuantificó las proteínas por espectrofotometría mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) realizando una curva de calibración preparada con albúmina de suero bovino.

8. Detección de TOR fosforilado (TOR-P)

Las proteínas (5 μ g) fueron separadas por electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturante que constaba de un gel concentrador al 6% y un gel resolutivo del 12%, utilizando un voltaje constante de 110 V durante 1,5 h. Las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa utilizando un sistema Trans-Blot (Bio-Rad) a 400 mA y 4 °C durante 1 h. La transferencia de las proteínas se verificó tiñendo las proteínas en la membrana con el colorante rojo Ponceau y se destiñó lavando con agua destilada. La membrana de nitrocelulosa fue incubada con 10 mL de TTBS (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 0,1 mM y Tween-20 al 0,1%) y suplementada con leche descremada al 5% por 1 h y se lavó tres veces con TTBS a temperatura ambiente durante 10 min. La membrana se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-TOR fosforilado en la Ser2448 de *Arabidopsis* (1: 1000, Abcam ab109268) y con anticuerpo

anti-subunidad mayor de la rubisco RbcL (1: 2500, Agrisera AS03037) a temperatura ambiente durante 1 h. La membrana se lavó tres veces con TTBS a temperatura ambiente durante 10 min. La membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con HRP (Agrisera, AS09602) a temperatura ambiente durante 1 h y se lavó tres veces con TTBS a temperatura ambiente durante 10 min. La membrana se incubó con un sustrato quimio-luminiscente Super Signal West Femto (Thermo Scientific, Rockford, IL, EE.UU.) durante 5 minutos y se expuso a una película de rayos X (Thermo Scientific, Rockford, IL, EE.UU.) durante 3 min para detectar TOR-P ser2448 o durante 30 s para detectar RbcL. Las bandas en la película fueron escaneadas y luego se cuantificaron usando el software Image Studio (Li-Cor, USA).

9. Extracción de ARN total

El ARN total de las hojas de *E. globulus* se extrajo según lo descrito por Morante *et al.* (2014), con modificaciones. Las hojas (1 g) fueron congelados en nitrógeno líquido y pulverizadas en un mortero de porcelana con ayuda de un pistilo. Se agregaron 10 mL de buffer de extracción A (Tris HCl 100 mM pH 8,0, sorbitol 0,35 M, polietilenglycol 6000 al 10% p/v y β -mercaptoetanol 2% p/v) y se continuó con la homogenización hasta que la muestra se descongeló. La mezcla se agitó en vórtex por 1 min, se centrifugó a 3.500 rpm a 4 °C durante 15 min y se eliminó el sobrenadante. El precipitado fue solubilizado en 10 mL de buffer de extracción B (Tris-HCl 300mM pH 8,0, EDTA 25mM, NaCl 2M, CTAB 2% p/v, espermidina 0,05% p/v, PVPP 2% p/v, y β -mercaptoetanol 2% p/v). La solución fue incubada a 65°C por 10 min y agitada cada 2 min usando un vórtex. Se añadió un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), la mezcla se centrifugó a 5.000 rpm a 4 °C durante 10 min y se recuperó la fase acuosa. Se agregó un vol de cloroformo: alcohol isoamílico, se centrifugó a 10.000 rpm a 4 °C durante 10 min y se recuperó la fase acuosa. Se agregaron 0,1 vol de acetato de sodio 3 M, pH 5,2 y 0,6 vol de isopropanol y la mezcla se incubó a -80 °C durante 30 min. La mezcla se centrifugó a 20.000 rpm a 4 °C durante 20 min y se eliminó el sobrenadante. El sedimento se solubilizó en 1 mL de agua tratada con DEPC. El ARN total fue precipitado por adición de 0,3 vol de cloruro de litio 10 M e incubando la mezcla a 4 °C durante una noche. La mezcla se centrifugó a 16.000 rpm a 4 °C durante 30 min y se eliminó el

sobrenadante. El ARN fue solubilizado en 0,1 mL de agua tratada con DEPC y se agregó 0,1 vol de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y 2 volúmenes de etanol puro frío. La mezcla se centrifugó a 16.000 g a 4 °C durante 20 min y se descartó el sobrenadante. El precipitado fue lavado con 200 µL de etanol frío al 70%, se centrifugó a 13.000 rpm a 4 °C durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. El precipitado de ARN fue secado a temperatura ambiente y solubilizado en 50 µL de agua tratada con DEPC. La concentración y pureza del ARN fue determinada midiendo en un espectrofotómetro la razón de absorbancia a 260/280 nm y mediante electroforesis en un gel de agarosa. El ARN total se almacenó a -80 °C para los posteriores análisis de expresión génica.

10. Diseño de partidores para PCR en tiempo real

Los partidores para PCR fueron diseñados a partir de secuencias nucleotídicas de mRNA de la base de datos del NCBI utilizando la herramienta Primer-BLAST (ver Tabla 1). Se diseñaron partidores para detectar enzimas involucradas en el aumento de glucosa tales como la fructosa 1,6 bifosfatasa 1 (*fbp1*), enzima de síntesis de glucosa y α -amilasa 3 (*amy3*), enzima que participa en la degradación del almidón y produce glucosa, y el consumo de glucosa como la ADP-glucosa pirofosforilasa 1 (*apl1*), enzima que participa en la síntesis de almidón. Además, se diseñaron partidores para detectar los transcritos de proteínas implicadas en la vía TOR tales como la quinasa TOR quinasa (*tor*) y la quinasa S6K (*s6k*), la cual es activada por TOR. Se diseñaron partidores para detectar las proteínas de los fotosistemas y síntesis de clorofila tales como la subunidad A del fotosistema II (*psbA*), la subunidad Rieske del complejo citocromo b6f (*petC*), plastocianina (*petE*) y subunidad F del fotosistema I (*psaF*) y la enzima magnesio quelatasa (*chlH*). Se diseñaron partidores para amplificar la enzima clave en la asimilación de C como la subunidad mayor de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (*rbcL*), enzimas claves de la asimilación de N tal como glutamina sintasa (*gs1*) y glutamato deshidrogenasa (*gdh2*) y enzimas involucradas en la asimilación de S tal como la O-acetilserina tiol liasa (*cysK*) y 5'-adenililsulfato reductasa (*apr2*).

Finalmente, se diseñaron partidores para detectar enzimas del metabolismo secundario tal como la fenilalanina amoniaco liasa 1 (*pall*), enzima clave de la

ruta fenilpropanoide, y la terpeno sintasa 1 (*ts1*), una enzima involucrada en la síntesis de terpenos. Estos partidores de PCR se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de los partidores usados para qRT-PCR

Gen	Secuencia del partidor	T° Annealing	Producto (pb)	Especie
<i>psaF</i> -F	5' – GCTCAAGAAGCTGGAGTCGT-3'	59 °C	114	<i>Amborella trichopoda</i>
<i>psaF</i> -R	5' – TGCTTGCCGTAGTTGTCGAA -3'			
<i>psbA</i> -F	5' – AGAGAGACGCGAAAAGCGAAA-3'	60 °C	191	<i>Ricinus communis</i>
<i>psbA</i> -R	5' – GGGCAGCAATGAAAGCGATA-3'			
<i>petC</i> -F	5' – GAAGGAAAGGTGCTGGTGGT-3'	60 °C	71	<i>Eucalyptus grandis</i>
<i>petC</i> -R	5' – CCGTATGTGTCCAGCGTTTT-3'			
<i>petE</i> -F	5' – TGTTCAAAGAACTACGCCGGG-3'	60 °C	152	<i>Eucalyptus grandis</i>
<i>petE</i> -R	5' – GCCTTTCTCGGTCAAGGTCA-3'			
<i>chlH</i> -F	5' – TCTGCGCTCTCTGTTTCGTTT-3'	60 °C	132	<i>Eucalyptus grandis</i>
<i>chlH</i> -R	5' – GCCTTGGGAGCTGGTAATGT-3'			
<i>rbcL</i> -F	5' – GCATATGCCTGCTTTGACCG-3'	60 °C	165	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>rbcL</i> -R	5' – TCGACTGCAAGATCACGTCC-3'			
<i>gs1</i> -F	5' – CCGGGATCAACATCAGTGGG-3'	60 °C	156	<i>Eucalyptus grandis</i>
<i>gs1</i> -R	5' – CCGGGATCAACATCAGTGGG-3'			
<i>gdh2</i> -F	5' – CCGTGGCGTTGTTTTTGCTA-3'	59 °C	115	<i>Eucalyptus grandis</i>
<i>gdh2</i> -R	5' – CAACCTTGCTGCCCAAGACC-3'			
<i>cysK</i> -F	5' – TATGGAAAAGGCACGGATGGG-3'	58 °C	211	<i>Medicago trunculata</i>
<i>cysK</i> -R	5' – AAGACACCAGGGACAAAGCC-3'			
<i>apr2</i> -F	5' – CACAGATTGGCTTGTTCCGC-3'	59 °C	199	<i>Eucalyptus grandis</i>
<i>apr2</i> -R	5' – AACCGCTCGTAATCCTCCAC-3'			
<i>pal1</i> -F	5' – ACACAAGAGCAACGGAGGAG-3'	58 °C	221	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>pal1</i> -R	5' – TCCTTCTGAAGTGCACACC-3'			
<i>ts1</i> -F	5' – AAGCGGTGACAAAAGCGTTC-3'	59 °C	123	<i>Eucalyptus grandis</i>
<i>ts1</i> -R	5' – CCACAGCATTGAGGTCCCAT-3'			
RNAr18S-F	5' – GTGCACAAAATCCCGACTCT-3'	59 °C	168	<i>Eucalyptus grandis</i>
RNAr18S-R	5' – GCGATCCGTCGAGTTATCAT-3'			

11. Cuantificación de transcritos mediante qRT-PCR

El nivel relativo de los transcritos se cuantificó mediante qRT-PCR usando el kit Sensimix One-Step (Quantace, UK) que contenía Fluoróforo SYBR® Green I a una concentración 5x, mezcla de reacción que contenía tampón de reacción 2x y transcriptasa reversa MMLV 200 U/ μ L, DNA polimerasa 5 U/ μ L, dNTPs 10 μ M, MgCl₂ 2mM, inhibidor de RNAsa 10 μ M, 75 ng de RNA total y partidores 200 nM. La reacción de qRT-PCR se realizó en un termociclador Rotorgene 6000 (Corbett, Sidney, Australia). La amplificación de los transcritos se obtuvo realizando 1 ciclo de transcripción reversa 10 min a 45 °C y 40 ciclos de desnaturación a 95 °C por 2 min, hibridación de los partidores por 15 s y extensión a 72 °C por 20 s. Como control de expresión constitutiva se utilizó el rRNA 18S y el nivel de este transcrito no cambió a lo largo de semanas en plantas control o tratadas. Se realizaron tres amplificaciones independientes de cada transcrito y del transcrito d expresión constitutiva y el nivel relativo de transcritos fue expresado como $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Con este fin, los valores medios de las muestras de control se restaron a los valores medios de las muestras tratadas para determinar el cambio en la expresión.

12. Análisis estadísticos

Se determinaron diferencias significativas mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey. Las diferencias significativas se obtuvieron a partir de tres réplicas independientes. Las diferencias entre tratamientos se consideraron significativas a una probabilidad de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

1. Aumento en la altura y la fotosíntesis neta inducido por OC kappa

Se determinó el incremento de la altura y el nivel de fotosíntesis neta en los *E. globulus* tratados con agua (control, n=10) o con OC kappa 1 mg mL⁻¹, (tratados, n=10) una vez a la semana, cuatro veces en total. El incremento en altura de los árboles del grupo control fue de 35 cm y la de los árboles tratados fue 72 cm a los cuatro meses de cultivo post-tratamiento. Esto representa un incremento en altura de 105 % en los árboles tratados comparado con el control (Fig. 4A). Además, los árboles tratados mostraron un aumento en la fotosíntesis neta comenzando en la semana 3. El aumento de la fotosíntesis permaneció hasta la semana 21 siendo de 48,2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en los árboles control y de 61,6 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en los árboles tratados, lo cual representa un aumento de 29 % en la fotosíntesis neta en los árboles tratados comparado con los controles (Fig. 4B).

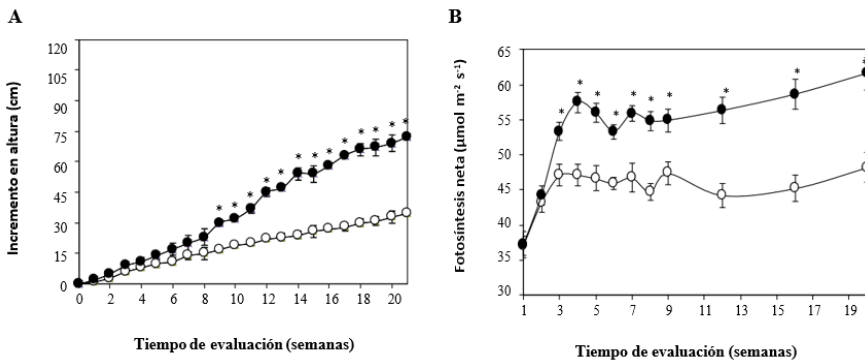


Fig. 4. Incremento en altura (A) y fotosíntesis neta (B) en *E. globulus* control (círculos blancos) y tratados con OC kappa a una concentración de 1 mg mL⁻¹ (círculos negros), cultivados por cuatro meses post-tratamiento. La altura está expresada en centímetros y la fotosíntesis neta en micro-moles por metro cuadrado por segundo. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los árboles tratados con OC kappa y los árboles de control. Los círculos representan el valor promedio de diez mediciones independientes para la altura y fotosíntesis $\pm$ SD.

2. Aumento de la clorofila total inducido por OC kappa

Se determinó la cantidad de clorofila total en los árboles control y tratados con OC kappa, observándose un nivel más alto de clorofila total en los árboles tratados comparados con los árboles control a partir de la semana 3-8 (113, 115, 118, 127, 172, 137 $\mu\text{g g}^{-1}$ de tejido fresco, respectivamente) y luego a las semanas 10 y 11 (161 y 152 $\mu\text{g g}^{-1}$ de tejido fresco, respectivamente). Posteriormente, los niveles de clorofila total disminuyeron hasta alcanzar el nivel de los árboles controles y su valor promedio fue de 115 $\mu\text{g g}^{-1}$ de tejido fresco (TF). Adicionalmente se determinó la razón entre clorofila a/b para determinar el efecto fisiológico de la clorofila sobre la fotosíntesis observándose que la proporción es muy similar al control lo que indicaría que el aumento de clorofilas no afectaría la eficiencia fotosintética (Fig. 5).

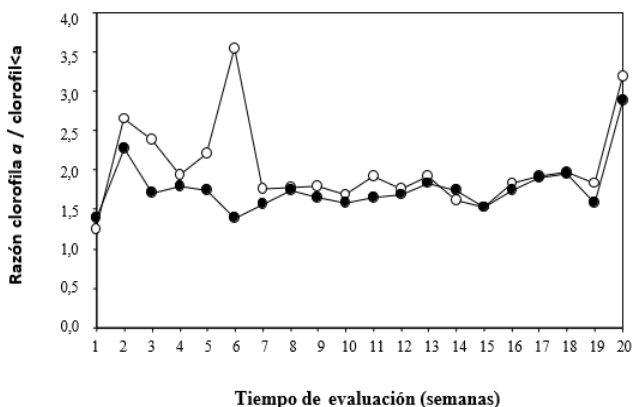


Fig. 5. Razón clorofila a/b en *E. globulus* control (círculos blancos) y tratados con OC kappa a una concentración 1 mg mL⁻¹ (círculos negros) durante las 20 semanas de evaluación del experimento.

3. Aumento en el nivel de glucosa inducido por OC kappa

Los árboles tratados mostraron en general niveles más altos de glucosa comparados con los controles desde la semana 1 (56,90 mg g⁻¹ TF) y luego a las semanas 9-11, (72,07; 94,83 y 111,90 mg g⁻¹ TF, respectivamente) y 17-19 (57,28; 60,69 y 68,28 mg g⁻¹ TF, respectivamente) (Fig. 6)

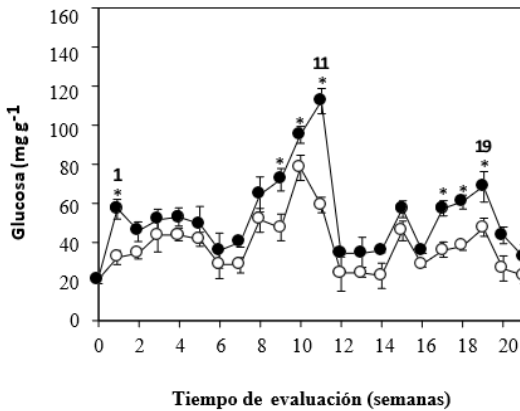


Fig. 6. Cantidad de glucosa en *E. globulus* control (círculos blancos) y tratados con OC kappa a una concentración de 1 mg mL⁻¹ (círculos negros) cultivados por cuatro meses post-tratamiento. La cantidad de glucosa está expresada en miligramos por gramo de tejido fresco (TF). Los números sobre círculos representan semanas de cultivo y los asteriscos (*) indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los árboles tratados con OC kappa y los árboles de control. Los círculos representan el valor medio de tres mediciones independientes $\pm$ SD.

4. Aumento de la síntesis de trehalosa inducido por OC kappa

El contenido de trehalosa aumentó en los árboles tratados con OC kappa comparado con los controles desde las semanas 1-3 (0,87; 0,83 y 0,88 $\mu\text{g g}^{-1}$ TF, respectivamente) y luego a las semanas 5 (0,82 $\mu\text{g g}^{-1}$ TF), 8-9 (0,50 y 1,39 $\mu\text{g g}^{-1}$ TF, respectivamente), 12 (0,41 $\mu\text{g g}^{-1}$ TF), 15-16 (0,41 y 1,10 $\mu\text{g g}^{-1}$ TF, respectivamente) y 18-21 (0,40; 0,84; 0,46 y 0,55 $\mu\text{g g}^{-1}$ TF, respectivamente) (Fig. 7). El contenido de trehalosa en los *Eucalyptus* control fue de 0,28 $\mu\text{g g}^{-1}$ TF y en los árboles tratados con OC kappa fue de 0,54 $\mu\text{g g}^{-1}$ TF a los 4 meses post-tratamiento, lo que corresponde a un aumento de 93 %.

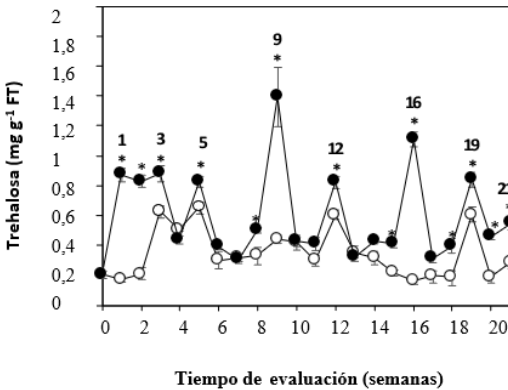
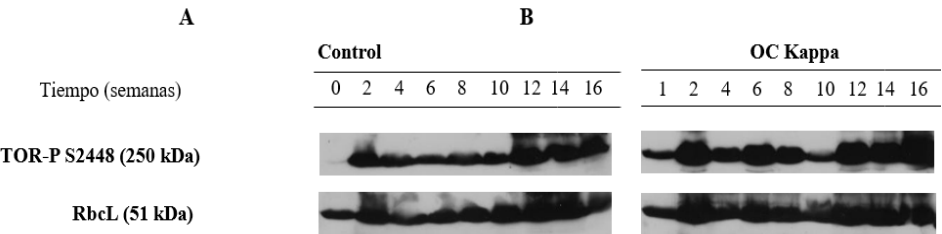


Fig. 7. Contenido de trehalosa *E. globulus* en árboles control (círculos blancos) y tratados con OC kappa a una concentración 1 mg mL⁻¹ (círculos negros) cultivados por cuatro meses post-tratamiento. El contenido de trehalosa está expresada en miligramos por gramo de tejido fresco (TF). Los números sobre círculos representan semanas de cultivo y los asteriscos (*) indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los árboles tratados con OC kappa y los árboles de control. Los símbolos representan el valor medio de tres mediciones independientes.

5. Aumento en el nivel de TOR-P y en los transcritos de TOR inducido por OC kappa

Para analizar si el aumento de glucosa y/o trehalosa puede inducir la activación de la quinasa TOR, se detectó el nivel de TOR fosforilado en ser2424 (TOR-P) utilizando un anticuerpo específico anti TOR-P humano fosforilado en la ser 2448 (Fig. 8A). Cabe mencionar que se ha comprobado que esta fosforilación está presente en TOR de *Arabidopsis thaliana* (Schepetilnikov et al., 2013, Schepetilnikov et al., 2017; Schepetilnikov y Ryabova, 2018). El nivel de TOR activo fue normalizado con respecto al nivel de la subunidad mayor de la rubisco, RbcL (Fig. 8B). Los árboles tratados con OC kappa mostraron un nivel relativo más alto de TOR-P a partir de la semana 1 y luego a las semanas 2, 6, 12 y 16 (Fig. 8C).

Para detectar si el aumento en TOR-P se debe a un aumento de TOR reflejado en el aumento de los transcritos de *tor*, se detectó el nivel relativo de *tor*, observando que las plantas tratadas con OC kappa se mostraron un incremento a las semanas 3, 6, 10, 11, 13 y 17 de 8,00, 5,06, 3,73, 4,18, 3,68 y 2,35, respectivamente. Por lo tanto, OC kappa aumentó la cantidad de transcritos de *tor* en las plantas tratadas a partir de la semana 3 y un aumento de 1,7 veces a los 4 meses post-tratamiento (Fig. 8D). Esto sugiere que el aumento de TOR-P podría deberse a un aumento de TOR dada por el aumento de la expresión del gen *tor*.



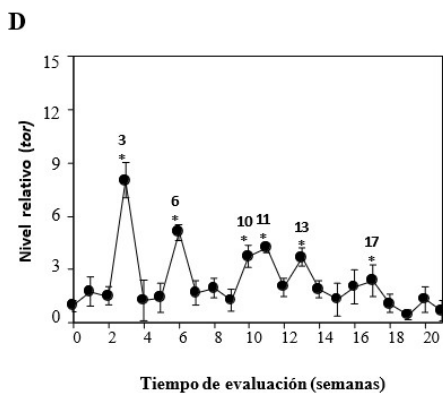
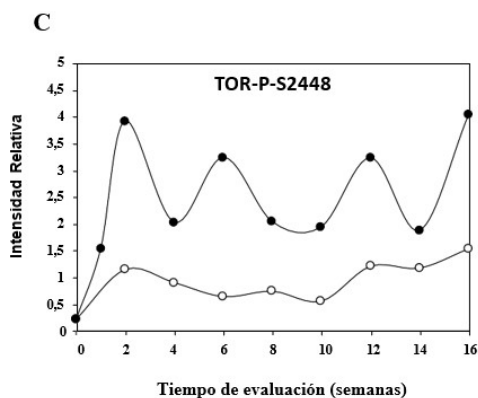


Fig. 8. Nivel de TOR quinasa activa (TOR-P ser4448) y subunidad mayor de la rubisco RbcL en el control (A) y en árboles de *E. globulus* tratados con OC kappa a 1 mg mL⁻¹ (B). Los niveles de TOR (C) activos se expresan en unidades relativas de intensidad de banda correspondientes a la relación TOR / RbcL. Nivel transcripcional relativo de la quinasa TOR (*tor*, D) en árboles de control y *E. globulus* tratados con OC kappa a 1 mg mL⁻¹. Los números sobre círculos resaltan semanas cuando se observaron los picos de parámetros más importantes. Para la Fig. 8D, los asteriscos (*) representan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el nivel transcripcional a una semana determinada en comparación con la expresión al comienzo de los experimentos (semana 0). El nivel transcripcional se expresa como $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Los círculos representan valores medios de tres experimentos independientes $\pm$ SD.

6. Incremento en el nivel relativo de transcritos en enzimas involucradas en la producción de glucosa y almidón inducido por OC kappa

Para analizar si el aumento en el nivel de glucosa se debe a un aumento de transcritos y probablemente de la enzima fructosa-1,6-bifosfatasa (*fbp1*), implicada en la síntesis de glucosa, α -amilasa 3 (*amy3*), implicada en la degradación de almidón y producción de glucosa y la ADP-glucosa pirofosforilasa 1 (*apl1*), enzima determinante en la síntesis de almidón y que disminuye el nivel de glucosa. Se obtuvo RNA total de *E. globulus* control y tratados con OC kappa y se analizó el nivel relativo de transcritos mediante RT-PCR en tiempo real, utilizando el rRNA 18S como control interno de expresión. El nivel relativo de la fructosa-1,6-bifosfatasa (*fbp1*), en las plantas tratadas con OC-kappa a las semanas 3, 6, 8, 10, 13 y 15 fue de 7,52, 2,57, 3,36, 3,312, 3,94 y 2,90, respectivamente, comparado con el control. Por lo tanto, OC kappa aumento la cantidad de transcritos de la fructosa-1,6-bifosfatasa (*fbp1*), en las plantas tratadas a partir de la semana 3, observándose todavía un aumento de 2,3 veces a los 4 meses post-tratamiento (Fig. 9A). El nivel relativo de la α -amilasa 3 (*amy3*), en las plantas tratadas con OC kappa a las semanas 1, 3, 7, 8, 10, 11, 13 y 16 fue de 2,84, 2,75, 3,93, 8,57, 9,16, 13,0, 2,96 y 2,66, respectivamente, comparado con el control. Por lo tanto, el tratamiento con OC kappa aumentó la cantidad de transcritos de la α -amilasa 3 (*amy3*) en las plantas tratadas a partir de la semana 1, mostrándose todavía un aumento de 1,3 veces a los 4 meses post-tratamiento (Fig. 9B).

El nivel relativo de la ADP-glucosa pirofosforilasa (*apl1*), sólo mostró un incremento significativo en las plantas tratadas con OC kappa sólo a la semana 18, y fue de 11,04. Por lo tanto, OC kappa no aumentó la cantidad de transcritos de la ADP-glucosa pirofosforilasa en las plantas tratadas hasta la semana 17 (Fig. 9C). Por lo tanto, el tratamiento con OC kappa aumentó la cantidad de transcritos de enzimas que permiten un aumento de la cantidad de glucosa y no aumentó el nivel, de transcritos de una enzima clave que disminuye la cantidad de glucosa.

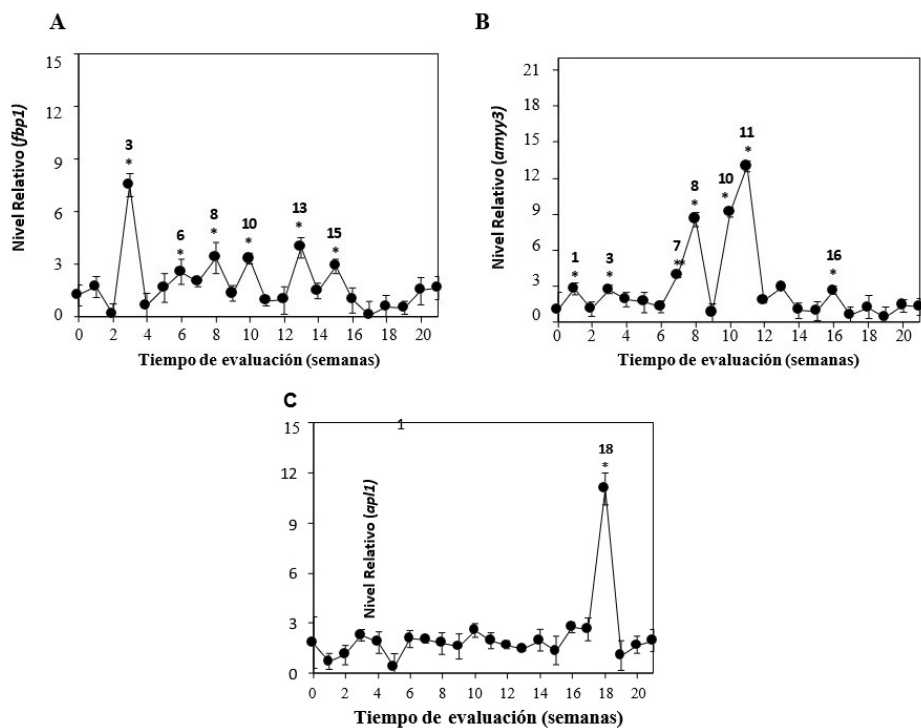


Fig. 9. Nivel relativo de transcritos que codifican enzimas fructosa-1,6-bisfosfatasa (*fbp1*, A) amilasa (*amy3*, B), y ADP-glucosa pirofosforilasa (*apl1*, C) en árboles control y tratados de *E. globulus* con OC kappa una concentración 1 mg mL⁻¹ cultivados por cuatro meses post-tratamiento. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el nivel transcripcional a una semana determinada en comparación con la expresión al comienzo de los experimentos (semana 0). El nivel transcripcional relativo se expresa como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los círculos representan el valor medio de tres triplicados independientes $\pm$ SD.

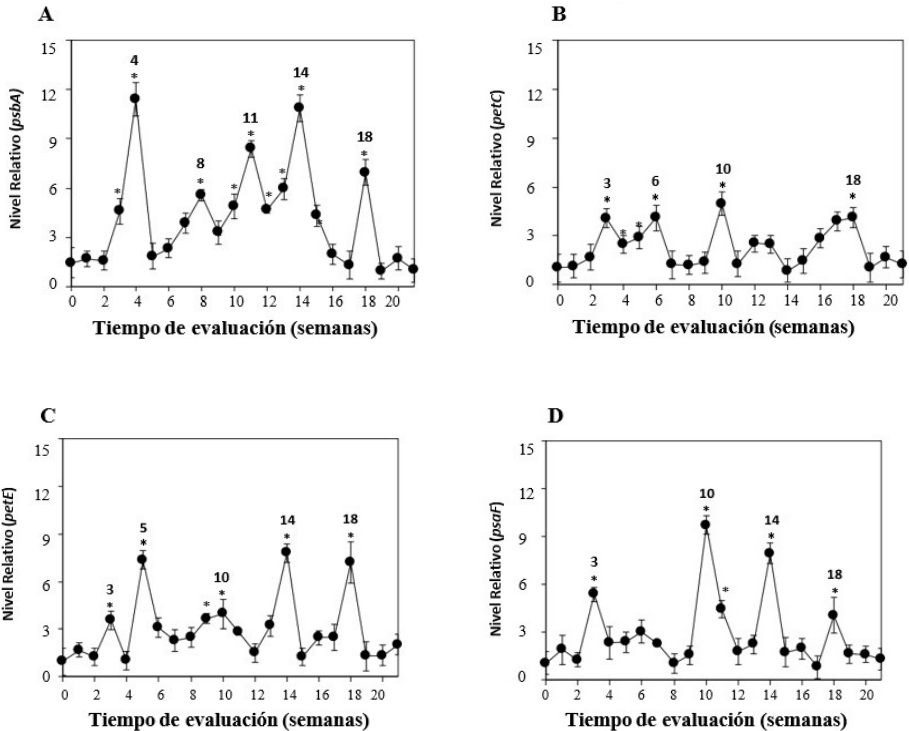
7. Aumento en el nivel relativo de transcritos en proteínas de fotosistemas y enzima de síntesis de clorofila inducido por OC kappa

Para explicar el aumento de la fotosíntesis neta inducido por OC kappa, se evaluó el nivel relativo de los transcritos que codifican para la subunidad D1 del PSII (*psbA*), la subunidad de Rieske del citocromo b6f (*petC*), la plastocianina (*petE*), la subunidad F del PSI (*psaF*), y el nivel relativo de transcritos que codifican para la enzima magnesio quelatasa (*chlH*), enzima clave en la síntesis de clorofila, en árboles de *E. globulus* control y tratados con OC-kappa. El nivel relativo para la subunidad D1 del PSII (*psbA*) en las plantas tratadas con OC kappa a las semanas 3, 4, 7, 8, 10, 11, 13, 14 y 18 fue de 4,06, 11,43, 3,85, 5,56, 4,89, 8,40, 5,94, 10,85 y 6,84, respectivamente, comparado con el control. Por lo tanto, el tratamiento con OC kappa aumentó la cantidad de transcritos de la subunidad D1 del PSII (*psbA*), en las plantas tratadas a partir de la semana 3, observándose todavía un aumento de 2,3 veces a los 4 meses post- tratamiento (Fig. 10A).

El nivel relativo de los transcritos que codifican para la subunidad de Rieske del citocromo b6f (*petC*) en las plantas tratadas con OC kappa a las semanas 3, 6, 10, 17 y 18 fue de 4,08, 4,11, 4,98, 3,89 y 4,13, respectivamente, comparado con el control. Por lo tanto, OC kappa aumentó la cantidad de transcritos de la subunidad de Rieske del citocromo b6f (*petC*), en las plantas tratadas a partir de la semana 3, observándose todavía un aumento de 1,5 veces a los 4 meses post-tratamiento (Fig. 10B). El nivel relativo de los transcritos que codifican para la plastocianina (*petE*) en las plantas tratadas con OC kappa a las semanas 3, 5, 10, 14 y 18 fue de 3,56, 7,36, 3,96, 7,81 y 7,21, respectivamente, comparado con el control. Por lo tanto, OC kappa aumentó la cantidad de transcritos de la plastocianina (*petE*), en las plantas tratadas a partir de la semana 3, observándose todavía un aumento de 3 veces a los 4 meses post-tratamiento) (Fig. 10C). El nivel relativo de los transcritos de la subunidad F del PSI (*psaF*) en las plantas tratadas con OC kappa a las semanas 3, 6, 10, 14 y 18 fue de 5,37, 3,04, 9,71, 7,94 y 4,06, respectivamente, comparado con el control. Por lo tanto, OC kappa aumento la cantidad de transcritos de la subunidad F del PSI (*psaF*), en las plantas tratadas a partir de la semana 3, observándose todavía un aumento de 1,9 veces a los 4 meses post-tratamiento (Fig. 10D). De este modo, se observaron aumentos en los niveles de transcritos de proteínas de los fotosistemas II y I en

respuesta a OC-kappa con niveles máximos a las semanas que se inician 3-4 y luego a las semanas 5-6, 8-9-10-11, 14, 17- 18.

Finalmente, el nivel relativo de transcritos que codifican para la enzima magnesio quelatasa (*chlH*), enzima involucrada en la síntesis de clorofila, aumentaron desde la semana 5 a la semana 15 en las plantas tratadas con OC kappa. Por lo tanto, OC kappa aumento la cantidad de transcritos de la enzima magnesio quelatasa (*chlH*), en las plantas tratadas a partir de la semana 3, observándose todavía un aumento de 3,8 veces a los 4 meses post-tratamiento (Fig. 10E). De este modo, se observaron aumentos en los niveles de transcritos de una enzima clave en la síntesis de clorofila en respuesta a OC-kappa con niveles máximos a partir de las semanas 5-15.



E

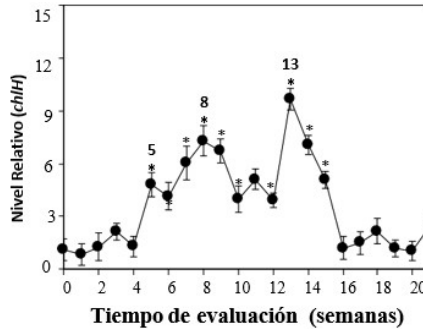


Fig. 10. Nivel relativo de transcritos que codifican la subunidad A del fotosistema II (*psbA*, A), subunidad Rieske del citocromo b6f (*petC*, B), plastocianina (*petE*, C), subunidad F pf fotosistema I (*psaF*, D) y magnesio quelatasa (*chlH*, E), en árboles control y tratados de *E. globulus* con OC kappa a una concentración de 1 mg mL⁻¹ (círculos negros) cultivados por cuatro meses postratamientos. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el nivel transcripcional en una semana determinada con la expresión al comienzo de los experimentos (semana 0). El nivel transcripcional relativo se expresa como $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Los círculos representan valores medios de tres experimentos independientes $\pm$ SD.

8. Aumento en el nivel relativo de transcritos de enzimas del metabolismo primario inducido por OC kappa

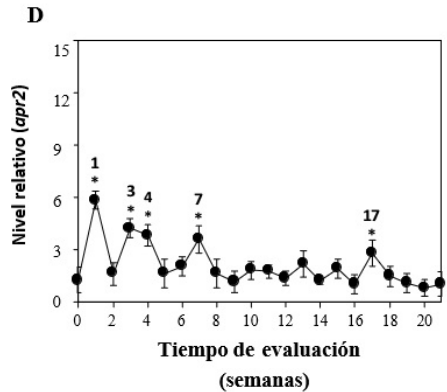
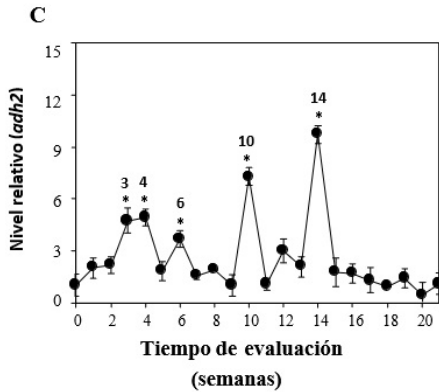
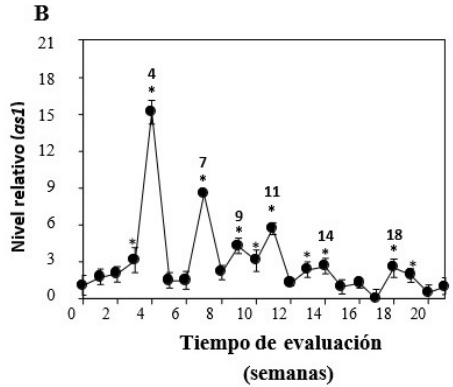
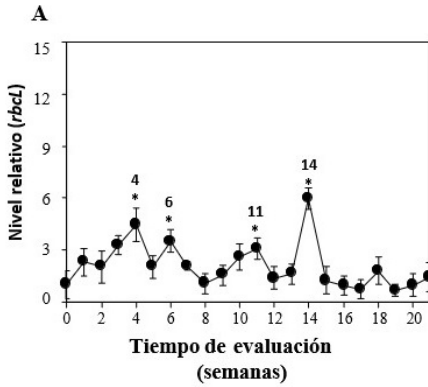
El nivel relativo de transcritos que codifican la subunidad mayor de la enzima rubisco (*rbcL*), enzima clave en la asimilación de C, en las plantas tratadas con OC kappa mostró un aumento significativo en las semanas 4, 6, 11 y 14 con valores de 4,45, 3,53, 3,10 y 5,96, respectivamente, comparado con el control. Por lo tanto, OC kappa aumentó la cantidad de transcritos de la enzima rubisco (*rbcL*) en las plantas tratadas a partir de la semana 3, observándose todavía un aumento de 1,7 veces a los 4 meses post- tratamiento (Fig. 11A). El nivel relativo de los transcritos que codifican la enzima glutamina sintasa (*gsI*), enzima clave la asimilación de nitrógeno, en las plantas tratadas con OC kappa mostró un aumento significativo en las semanas 4, 7, 9, 11, 14 y 18 con valores de 15,19, 8,51, 4,30, 5,72, 2,67 y 2,51, respectivamente, comparado con el control. Por lo tanto, OC kappa aumento la cantidad de transcritos de la enzima la enzima

glutamina sintasa (*gs1*) en las plantas tratadas a partir de la semana 4 y hasta a los 4 meses post- tratamiento (Fig. 11B). El nivel relativo de transcritos que codifican la enzima glutamato deshidrogenasa (*gdh2*), enzima involucrada en la asimilación de N, en las plantas tratadas con OC kappa a las semanas 3, 4, 6, 10 y 14 fue de 4,74, 4,92, 3,68, 7,26 y 9,71, respectivamente, comparado con el control. Por lo tanto, OC kappa aumentó la cantidad de transcritos de la enzima glutamato deshidrogenasa (*gdh2*) en las plantas tratadas a partir de la semana 3, observándose todavía un aumento de 1,8 veces a los 4 meses post-tratamiento (Fig. 11C).

El nivel relativo de los transcritos que codifican para la enzima adenosina 5'-fosfosulfato reductasa (*apr2*), enzima clave en la asimilación de S, en las plantas tratadas con OC kappa a las semanas 1, 3, 4, 7 y 17 fue de 5,84, 4,23, 3,82, 3,59 y 2,80, respectivamente, comparado con el control. Por lo tanto, OC kappa aumento la cantidad de transcritos de la la enzima adenosina 5'-fosfosulfato reductasa (*apr2*) en las plantas tratadas a partir de la semana 1, sin embargo, a los 4 meses post- tratamiento no mostro diferencias con la semana 0 (Fig. 11D).

El nivel relativo de los transcritos que codifican para la *O*- acetilserina tiol-liasa (*cysK*), una enzima involucrada en la asimilación de S, en las plantas tratadas con OC kappa a las semanas 3, 4, 6, 10, 14, 17 y 18 fue de 3,86, 4,53, 6,80, 6,19, 7,41, 4,04 y 4,50, respectivamente, comparado con el control. Por lo tanto, OC kappa aumentó la cantidad de transcritos de la enzima *O*-acetilserina tiol-liasa (*cysK*), en las plantas tratadas a partir de la semana 3, observándose todavía un aumento de 3,9 veces a los 4 meses post-tratamiento (Fig. 11E).

Por lo tanto, el nivel de transcritos de enzimas involucradas en la asimilación C, N y S aumentó con respecto al control en respuesta a OC kappa y se observaron niveles máximos a partir a las semanas 3-4, 6-7, 9-10-11, 13-14 y 17-18 y 19 mostrando en algunos casos un nivel aumentado con respecto al control a la semana 21.



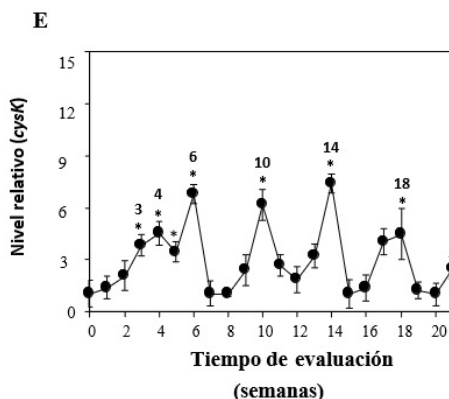


Fig. 11. Nivel relativo de transcritos que codifican la subunidad grande de ribulosa-1,5- carboxilasa/oxigenasa (*rbcl*, A), glutamina sintasa (*gs1*, B), glutamato deshidrogenasa (*gdh2*, C), 5'-adenilsulfato reductasa (*apr2*, D) y O-acetilserina tiol-liasa (*cysK*, E) en arboles control y tratados de *E. globulus* con OC kappa a una concentración de 1 mg mL⁻¹ (círculos negros) cultivados por cuatro meses postratamientos. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el nivel transcripcional a una semana determinada en comparación con la expresión al comienzo de los experimentos (semana 0). El nivel transcripcional se expresa como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los círculos representan valores medios de tres experimentos independientes $\pm$ SD.

9. Aumento en el nivel relativo de transcritos de enzimas del metabolismo secundario inducido por OC kappa

Para analizar las razones que explican el aumento de compuestos fenilpropanoides inducidos por OC kappa se evaluó el nivel relativo de transcritos que codifican la enzima fenilalanina amonio liasa (*pal*), primera enzima de la vía fenilpropanoide involucrada en la síntesis de compuestos fenilpropanoides, en las plantas tratadas con OC kappa a las semanas 3, 6, 7, 10 y 18 fue de 5,03, 4,76, 3,42, 8,66 y 4,20, respectivamente, comparado con el control. Por lo tanto, OC kappa aumentó la cantidad de transcritos de la enzima fenilalanina amonio liasa (*pal*) en las plantas tratadas a partir de la semana 3. Sin embargo, a los 4 meses post- tratamiento no mostro diferencias con la semana 0 (Fig. 12A). El nivel relativo de los transcritos que codifican la enzima terpeno sintasa (*ts1*), involu-

crada en la síntesis de terpenos, principal constituyente de los aceites esenciales, en las plantas tratadas con OC kappa a las semanas 3, 6, 10, 11, 12, 13 y 14 fue de 12,55; 5,43, 13,32; 5,28, 5,46, 5,37 y 7,36, respectivamente, comparado con el control. Por lo tanto, OC kappa aumento la cantidad de transcritos de la enzima terpeno sintasa (*ts1*), en las plantas tratadas a partir de la semana 3, sin embargo, a los 4 meses post- tratamiento no mostro diferencias con la semana 0 (Fig. 12B). De este modo, el nivel de transcritos de dos enzimas claves de síntesis de terpenos y compuestos fenólicos, con potencial efecto anti-insectos y antimicrobianos, aumentó en respuesta a OC kappa.

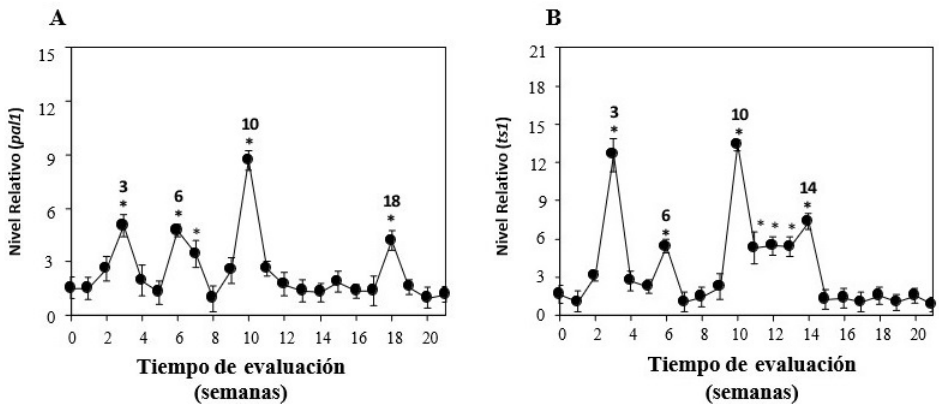


Fig. 12. Nivel relativo de transcritos que codifican fenilalanina amonio-liasa (*pal1*, A) y terpeno sintasa (*ts1*, B), en arboles control y tratados de *E. globulus* con OC kappa a una concentración de 1 mg . mL⁻¹ (círculos negros) cultivados por cuatro meses postratamientos. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas (p < 0.05) entre el nivel transcripcional a una semana determinada en comparación con la expresión al comienzo de los experimentos (semana 0). El nivel transcripcional se expresa como 2^{-ΔΔCt}. Los círculos representan valores medios de tres experimentos independientes ± SD.

DISCUSIÓN

1. OC kappa induce el aumento de la altura y la fotosíntesis

Los resultados muestran un aumento en altura a partir de la semana 9 en los árboles tratados, el cual fue de 105% a la semana 21 comparados con el control. Además, el tratamiento con OC kappa 1 mg mL⁻¹, indujo un aumento en la fotosíntesis a partir de la semana 3 manteniéndose hasta la semana 21, con un aumento del 29% en los árboles tratados con respecto al control. Por lo tanto, la estimulación del crecimiento de *E. globulus* se debe, al menos en parte, a un aumento de la fotosíntesis neta. En este sentido, se ha observado que la inhibición de la quinasa TOR en *Arabidopsis* utilizando AZD8055 y un análisis transcriptómico mediante un Illumina Hiseq2000 mostró una disminución en los transcritos que codifican para numerosas proteínas de los fotosistemas y enzimas de la síntesis de clorofila (Dong *et al.*, 2015). Sin embargo, hallazgos recientes han demostrado cómo la vía TOR actúa como un interruptor central para regular el metabolismo, la proliferación celular, el crecimiento de las plántulas y plantas adultas en respuesta a la glucosa y sacarosa derivadas directa o indirectamente de la fotosíntesis (Wu *et al.*, 2019). Por ejemplo, después de la germinación de semillas en el punto de transición de heterotrófico a fotoautotrófico, la aplicación exógena de glucosa y sacarosa (15 mM) pueden reemplazar a la fotosíntesis como el estímulo para promover la proliferación celular dependiente de TOR en los meristemas radiculares y los cotiledones (Xiong *et al.*, 2013). Por lo tanto, esto indica que la vía de señalización TOR puede ser activada por varias vías que confluyen hacia el crecimiento de las plantas.

2. OC kappa induce aumento en los niveles de glucosa y trehalosa

El tratamiento de *E. globulus* con OC kappa indujo un aumento inicial en el nivel de glucosa a la semana 1 y de trehalosa a las semanas 1-3 lo cual coincide con el aumento inicial de TOR-P a la semana 1-2. Esto sugiere que los aumentos en estos azúcares podrían estar relacionados con la fosforilación y la activación de TOR. A este respecto, se ha demostrado que el aumento de glucosa induce un aumento del nivel de G6P y T6P, un intermediario en la síntesis de trehalosa, y que el aumento de G6P y T6P inhiben a la quinasa SnrK1 (Nunes

et al. 2013a) la cual, a su vez, inhibe la quinasa TOR mediante fosforilación (O'Hara *et al.*, 2013). Por lo tanto, el aumento de la glucosa y trehalosa inducido por OC kappa debería conducir a un aumento en G1P, G6P y T6P lo cual podría inhibir directamente a SnrK1 lo cual favorecería la activación de la vía TOR y la estimulación del crecimiento (Nukarinen *et al.*, 2016).

Este aumento de glucosa a la semana 1 se debe al aumento en las transcritos de las enzimas implicadas en la producción de glucosa, tales como fructosa-1,6-bisfosfatasa y α -amilasa a las semanas 1-3. De manera concordante, no se observó un aumento en el nivel de transcritos de la ADP-glucosa pirofosforilasa implicada en la producción de almidón lo cual redundaría en una disminución del nivel de glucosa. Por lo tanto, el aumento en el nivel de glucosa se debería al aumento en la expresión y la actividad de las enzimas que producen glucosa lo cual produciría un aumento en G6P y G1P, como se muestra en Yadav *et al.*, (2014). De hecho, se ha demostrado que un aumento en los niveles de glucosa en *Arabidopsis thaliana* indujo un mayor nivel de transcritos que codifican las enzimas del ciclo de Krebs, síntesis de purinas y pirimidinas, enzimas de síntesis de ácidos grasos, enzimas de síntesis de glutatión y enzimas involucradas en el metabolismo secundario, como en la producción de fenilpropanoides, flavonoides y glucosinolatos (Xiong *et al.*, 2013). Sin embargo, otros azúcares, como la fructosa, galactosa y xilosa, son mucho menos efectivos. Ni los aminoácidos ni las hormonas de crecimiento de las plantas pueden sustituir los azúcares en el medio de nutrientes con nitrato y amonio. El papel indispensable de la glucosa se explica por el requisito de la glucólisis y la bioenergética mitocondrial para activar la proteína quinasa TOR monitorizada por la fosforilación de sus sustratos S6K1/2 directos y conservados en T449 y T455, respectivamente (Xiong y Sheen, 2012; Xiong *et al.*, 2013).

3. OC kappa induce el incremento en el nivel de TOR-P y de transcritos *tor*

OC kappa indujo un aumento en el nivel de TOR-P con niveles máximos en las semanas 2, 6, 12 y 16 de cultivo. Además, OC kappa aumentó en el nivel de los transcritos de *tor* en las semanas 3, 6, 10, 11, 13 y 17. Esto sugiere que el aumento de TOR-P se debe al menos en parte, al aumento de la expresión del gen *tor* lo cual debería redundar en un aumento de la cantidad de TOR. Por otra parte, cabe mencionar que concentraciones micromolares de rapamicina (50 μ M) o AZD8055 (250 Mm) no inhibieron el crecimiento de *Eucalyptus* tratados con OC kappa (datos no mostrados). En particular, mostraron un aumento en la altura, en vez de una disminución, en comparación con los controles. Esto sugiere que en *Eucalyptus* deberían existir vías alternativas diferentes a la vía TOR que también controlan el crecimiento y desarrollo de los árboles. En este sentido, se ha demostrado que TOR está codificado por un sólo gen en plantas y los mutantes de TOR muestran una detención en el desarrollo embrionario (Menand *et al.*, 2002).

Sin embargo, RAPTOR está codificado por dos genes y los mutantes dobles muestran un crecimiento mínimo de meristemas (Anderson *et al.*, 2005). Además, LST8 también está codificado por dos genes, pero sólo un gen es expresado. Los mutantes en el gen expresado LST8 se deterioran en el crecimiento y floración de las plantas y la adaptación a días largos (Moreau *et al.*, 2012). Esto sugiere que TOR puede retener una cierta actividad cuando la unión de RAPTOR o LST8 se deteriora. Además, recientemente se ha demostrado que la activación de TOR inhibe la autofagia y que existe una vía alternativa que es independiente de TOR que se activa por el estrés oxidativo y el estrés del retículo endoplásmico lo cual inhibe la autofagia (Pu *et al.*, 2017). Por lo tanto, *Eucalyptus* podría presentar una ruta alternativa que puede activarse cuando se inhibe la vía TOR lo cual explicaría la no inhibición del crecimiento en *Eucalyptus* tratados con AZD o rapamicina.

4. OC kappa induce aumento en el nivel de transcritos que codifican proteínas de fotosistemas y síntesis de clorofila

OC kappa indujo un aumento en los niveles de transcritos que codifican proteínas de PSII y PSI que pueden explicar, al menos en parte, el aumento en la fotosíntesis neta observado previamente en árboles de *E. globulus* cultivados hasta la semana 21. Además, OC kappa aumentó el nivel de clorofila observada en las semanas 3-11 y este aumento se solapa parcialmente con la mayor expresión de la enzima magnesio quelatasa, una enzima clave en la síntesis de clorofila, que aumenta en las semanas 5-15. Por lo tanto, el aumento en el nivel de clorofila puede deberse, al menos en parte, a una expresión incrementada de enzimas implicadas en su síntesis. En este sentido, se ha demostrado que la inhibición de TOR con AZD8055 conduce a una disminución en los transcritos que codifican proteínas involucradas en la fotosíntesis y síntesis de clorofila (Dong et al., 2015) lo cual indica que la activación de la vía TOR conduce al aumento de la fotosíntesis. Es importante mencionar que el aumento en la transcripción de proteínas de fotosistemas mostró un patrón oscilatorio que aumenta en las semanas 3-4, 5-8, 10, 14 y 18, lo que se correlaciona con el aumento en la transcripción de *tor* en las semanas 3, 6, 11 y 13, excepto que no hay aumento antes de la semana 18. Por lo tanto, el aumento en TOR activo puede inducir una expresión incrementada de proteínas que pertenecen a fotosistemas y, por lo tanto, el aumento en la fotosíntesis neta mencionado anteriormente.

5. OC-kappa induce el incremento en el nivel de transcritos que codifican enzimas del metabolismo basal y secundario

El tratamiento de *Eucalyptus* con OC kappa indujo una mayor expresión de los genes implicados en la asimilación de C, N y S presentando un patrón oscilatorio con aumentos en las semanas 3-4, 6-7, 10-11, 14 y 17-18. Esta última está de acuerdo con los aumentos previamente observados en las actividades de las enzimas implicadas en la asimilación C, rubisco; en la asimilación de N, GlnS y GDH; y en la asimilación S, APR y O-ASTL en árboles de *E. globulus* tratados con OC kappa (González et al., 2014a). Además, los transcritos que codifican enzimas implicadas en el metabolismo secundario, PAL y TS, también aumentaron en

respuesta a OC kappa que también muestra un patrón oscilatorio con aumentos en las semanas 3, 6, 10 14 y 18. Esto está de acuerdo con los resultados previos obtenidos en árboles de *E. globulus* tratados con OC kappa que muestran un aumento en los niveles de compuestos fenilpropanoides (González *et al.*, 2013b) así como en terpenos volátiles (González *et al.*, 2014c). De hecho, se ha demostrado que un aumento en los niveles de glucosa en *Arabidopsis thaliana* indujo un mayor nivel de transcripción de genes específicos de plantas que se requieren únicamente para el crecimiento y la defensa contra patógenos (Xiong *et al.*, 2013).

Por lo tanto, los aumentos en las actividades de las enzimas implicadas en la asimilación de C, N y S, la síntesis de fenilpropanoides y de terpenos se deben, al menos en parte, al aumento de la expresión de los genes que codifican las enzimas del metabolismo basal y secundario. El patrón oscilatorio mostrado por el nivel transcripcional de enzimas de metabolismo basal y secundario se correlaciona con un aumento en la transcripción de *tor* en las semanas 3, 6, 11 y 13, excepto que no hay aumento antes de la semana 18. Por lo tanto, es posible que el aumento en la actividad TOR pueda inducir un aumento en la expresión de las enzimas involucradas en el metabolismo basal y secundario.

6. Modelo de activación de la vía TOR inducido por OC kappa

OC kappa podría unirse inicialmente a un receptor de tipo lectina en la membrana celular lo cual llevaría a la potencial activación de quinasas que llevan a un aumento inicial de enzimas involucradas en la síntesis de glucosa y degradación de almidón lo que aumenta el nivel de glucosa y trehalosa. Este aumento de glucosa y trehalosa podría inhibir directamente a snRK1 permitiendo así la activación de TOR y de la vía TOR. En efecto, el nivel de TOR-P se ve aumentado a partir de la semana 2 así como la expresión del transcrito *tor* a partir a la semana 3. El aumento de TOR-P activaría la vía TOR lo cual llevaría a un aumento de los transcritos de proteínas de fotosistemas y clorofila a partir de las semanas 3-4 lo cual llevaría a un aumento de la fotosíntesis neta a la semana 3. El aumento de la fotosíntesis llevaría luego al

aumento del crecimiento a partir de la semana 9. Además, el nivel de expresión de enzimas del metabolismo basal tales como aquellas implicadas en la asimilación de C, N y S también favorecería el aumento en el crecimiento de *E. globulus* (ver modelo en Fig. 13). Asimismo, el aumento en los transcritos de enzimas que sintetizan metabolitos secundarios con actividad antipatogénica llevaría a una estimulación de las respuestas de defensa en *E. globulus*.

Por lo tanto, el aumento en el crecimiento de *E. globulus* se debe, al menos en parte, al aumento masivo de genes involucrados en la fotosíntesis y el metabolismo primario, así como el aumento en las respuestas de defensa se debe a un aumento concomitante de la expresión de genes involucrados en la defensa. En síntesis, OC kappa induce un aumento inicial del nivel de glucosa y trehalosa lo que conduce a la activación de la vía TOR y un aumento en la expresión de genes involucrados en el metabolismo basal lo que conduce a un aumento en el crecimiento en *E. globulus*.

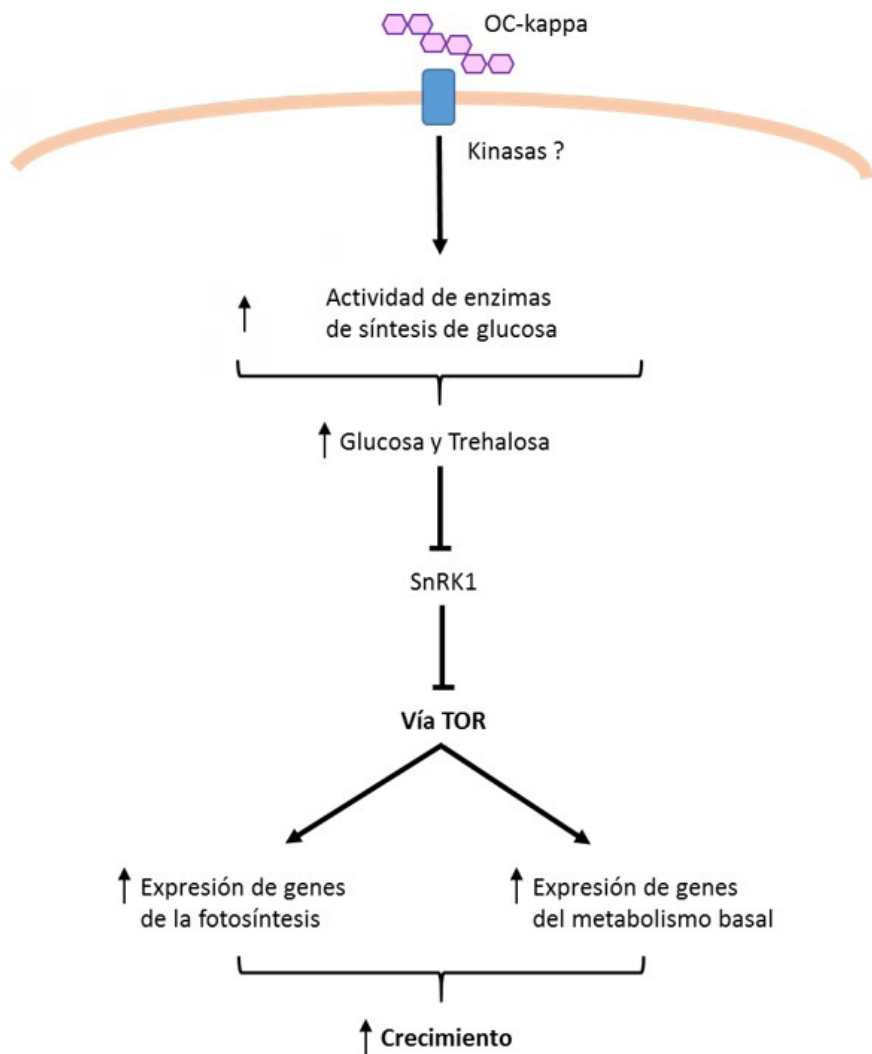


Fig. 13. Modelo propuesto para la activación de la vía TOR y el crecimiento inducido por OC kappa en *E. globulus*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad LV, Nasimova IR, Relleve LS, Aranilla CT, De la Rosa AM, Shibayama M (2004) Dynamic light scattering studies of irradiated kappa carrageenan. *Int. J. Biol. Macromol.* 34(2), 81-88. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2004.03.012.

Agredano-Moreno LT, Reyes de la Cruz H, Patricio Martínez-Castilla L, Sánchez de Jiménez E. (2007). Distinctive expression and functional regulation of the maize (*Zea mays* L.) TOR kinase ortholog. *Mol Biosyst* 3(11), 794-802. doi.org/10.1039/b705803a.

Ahmed, H. E., Elhusseiny, A. Y., Maimona, A. K., and Qaid, E.A. (2013) Trehalose accumulation in wheat plant promotes sucrose and starch biosynthesis. *Jord. J. Biol. Sci.* 6(2), 143-150. doi:10.12816/0000272.

Ahn CS, Ahn HK, Pai HS. (2015) Overexpression of the PP2A regulatory subunit Tap46 leads to enhanced plant growth through stimulation of the TOR signalling pathway. *J. Exp. Bot.* 66(3), 827-40. doi:10.1093/jxb/eru438.

Albert V, Hall MN (2015). mTOR signaling in cellular and organismal energetics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 33, 55–66. doi: 10.1016/j.ceb.2014.12.001.

Anderson GH, Veit B, Hanson MR (2005) The Arabidopsis AtRaptor genes are essential for post-embryonic development. *BMC Biol.* 31(1), 12. doi:10.1186/1741-7007-3- 12.

Apelt F, Breuer D, Olas JJ, Annunziata MG, Flis A, Nikoloski Z, Flis, A.y Stitt M. (2019) Circadian, Carbon, and Light Control of Expansion Growth and Leaf Movement. *Plant. Phys.* 174, 1949–1968. doi.org/10.1104/pp.17.00503.

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

Bai MY, Shang JX, Oh E, Fan M, Bai Y, Zentella R, Sun TP, Wang ZY (2012) Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in Arabidopsis. Nat. Cell Biol. 14(8), 810–817. doi:10.1038/ncb2546.

Bakshi A, Moin M, Kumar MU, Reddy AB, Ren M, Datla R, Siddiq EA, Kirti PB (2017) Ectopic expression of Arabidopsis Target of Rapamycin (AtTOR) improves water- use efficiency and yield potential in rice. Sci. Rep. 7, 42835. doi: 10.1038/srep42835.

Bellande K, Bono JJ, Savelli B, Jamet E, y Canut H. (2017) Plant Lectins and Lectin Receptor-Like Kinases: How Do They Sense the Outside? Int. J. Mol. Sci. 18(6), 1164. doi:10.3390/ijms18061164.

Bosotti R, Isacchi A, Sonnhammer ELL. (2000) FAT: A novel domain in PIK-related kinases. Trends. Biochem. Sci. 25(5), 225-227. doi:10.1016/S0968-0004(00)01563-2.

Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for 500 quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72(1-2), 248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Broeck T, Hulsmans S, Rolland F (2016) The plant energy sensor: evolutionary conservation and divergence of SnRK1 structure, regulation, and function. J. Exp. Bot. 67(22), 6215-6252. doi:10.1093/jxb/erw416.

Caldana C, Li Y, Leisse A, Zhang L, Bartholomaeus L, Fernie AR, Willmitzer L, et al. (2013) Systemic analysis of inducible target of rapamycin reveals a general metabolic switch controlling growth in Arabidopsis thaliana. Plant J. 73(6), 897- 899. doi: 10.1111/tpj.12080.

Castro J, Vera J, González A, Moenne A (2012) Oligo-carrageenans stimulate growth by enhancing photosynthesis, basal metabolism, and cell cycle in tobacco plants (var. Burley). J. Plant Growth Regul. 31(2), 173-185. doi:10.1007/s00344-011- 9229-5.

Cao X, Aufsatz W, Zilberman D, Mette MF, Huang MS, Matzke M, Jacobsen SE. (2003) Role of the DRM and CMT3 methyltransferases in RNA-directed DNA methylation. *Curr. Biol.* 13(24), 2212–2217. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14680640>.

Crespo JL, Díaz-Troya S, Florencio FJ (2005) Inhibition of target of rapamycin signaling by rapamycin in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 139(4), 1736–1749. doi:10.1104/pp.105.070847.

Deng K, Yu L, Zheng X, Zhang K, Wang W, Dong P, Zhang J, Ren M (2016) Target of rapamycin is a key player for auxin signaling transduction in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 7:291. doi: 10.3389/fpls.2016.00291.

Deprost D, Yao L, Sormani R, Moreau M, Leterreux G, Nicolai M, Bedu M, Robaglia C, Meyer C (2007) The *Arabidopsis* TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Rep.* 8(9), 864–870. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1973950/pdf/7401043.pdf>.

De Vleeschauwer D, Filipe O, Hoffman G, Seifi H, Haeck A, Canlas P, Van Bockhaven J, De Waele E, Demeestere K, Ronald P, Hofte M (2018) Target of rapamycin signaling orchestrates growth–defense trade-offs in plants. *New Phytol.* 217(1): 305–319. doi: 10.1111/nph.14785.

Dobrenel T, Caldana C, Hanson J, Robaglia C, Vincent M, Veit B, Meyer C (2016a) TOR signaling and nutrient sensing. *Annu. Rev. Plant Biol.* 67, 281–285. doi:10.1146/annurev-arplant-043014-114648.

Dobrenel T, Mancera-Martínez E, Forzani C, Azzopardi M, Davanture M, Moreau M, Schepetilnikov M, Chicher J, Langella O, Zivy M, Robaglia C, Ryabova LA,

Hanson J, Meyer C.(2016b) 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. *Front. Plant Sci.* 7(1611), 1–16. doi: 10.3389/fpls.2016.01611.

Dobrenel T, Marchive C, Sormani R, Moreau M, Mozzo M, Montane M, Menand B, Robaglia C, Meyer C. (2011) Regulation of plant growth and metabolism by the TOR kinase. *Biochem. Soc. Trans.* 39(2), 477–478. doi:10.1042/BST0390477.

Dong Y, Silbermann M, Speiser A, Forieri I, Linster E, Poschet G, Allboje Samami A, Wanatabe M, Sticht C, Teleman AA, et al. (2017) Sulfur availability regulates plant growth via glucose-TOR signaling. *Nat. Commun.* 8(1), 1174. doi: 10.1038/s41467-017-01224-w.

Dong P, Xiong F, Que Y, Wang K, Yu L, Li Z (2015) Expression profiling and functional analysis reveals that TOR is a key player in regulating photosynthesis and phytohormone signaling pathways in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 6, 677. doi: 10.3389/fpls.2015.00677.

Fang W, Bi D, Zheng R, Cai N, Xu H, Zhou R, Lu J, Wan M, Xu X (2017) Identification and activation of TLR4-mediated signalling pathways by alginate-derived guluronate oligosaccharide in RAW264.7 macrophages. *Sci. Rep.* 7, 1663. doi:10.1038/s41598-017-01868-0.

Frank A, Mantioli C, Viana A, Vincentz M, Webb A, Dodd A (2018) Circadian entrainment in *Arabidopsis* by the sugar-responsive transcription factor bZIP63. *Curr. Biol.* 28(16), 2597–2606. doi: 10.1016/j.cub.2018.05.092.

Faurobert M, Pelpoir E, y Chaïb J. (2007) Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues. *Methods. Biol.Mol.* 355, 9-14. doi: 10.1385/1- 59745-227-0:9.

Garrocho-Villegas V, Aguilar R, Sánchez de Jiménez E (2013) Insights into the TOR-S6K signaling pathway in maize (*Zea mays* L.) pathway activation by effector receptor interaction. *Biochemistry* 52(51), 9129-9140. doi:10.1021/bi401474x.

González A, Moenne F, Gómez M, Sáez CA, Contreras RA, Moenne, A. (2014a) Oligo- carrageenan kappa increases NADPH, ascorbate and glutathione syntheses and TRR/TRX activities enhancing photosynthesis, basal metabolism, and growth in Eucalyptus trees. *Front. Plant Sci.* 5, 512. doi: 10.3389/fpls.2014.00512.

González A, Contreras RA, Zuñiga G, Moenne, A (2014b) Oligo-Carrageenan Kappa- induced reducing redox status and activation of TRR/TRX system increase the level of Indole-3-acetic Acid, Gibberellin A3 and trans-Zeatin in Eucalyptus globulus Trees *Molecules* 19(8), 12690-12698.doi:10.3390/molecules190812690

González A., Gutierrez-Cutiño M, Moenne A (2014c) Oligo-carrageenan kappa-induced reducing redox status and increase in TRR/TRX activities promote activation and reprogramming of terpenoid metabolism in Eucalyptus trees. *Molecules* 19(6), 7356-7367. doi: 10.3390/molecules19067356.

González A, Contreras RA, Moenne, A (2013b) Oligo-carrageenans enhance growth and content of cellulose, essential oils and polyphenolic compounds in Eucalyptus globulus trees. *Molecules* 18(8), 8740-8751. doi:10.3390/molecules18088740.

Graf A, Schlereth A, Stitt M, Smith AM (2010) Circadian control of carbohydrate availability for growth in Arabidopsis plants at night. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107(20), 9458–9463.

Grosse, H y Rosselot, F (2016) La potencialidad de nuevas plantaciones forestales en Chile. *Ciencia e Investigación Forestal*. Santiago. Chile. 22(1), 77-90. https://www.researchgate.net/publication/305721531_La_potencialidad_de_nuevas_plantaciones_forestales_en_Chile/download.

Henriques R, Bogre L, Horv B, Magyar Z (2014) Balancing act: matching growth with environment by the TOR signalling pathway. *J. Exp. Bot.* 65(10), 2691–701. doi:10.1093/jxb/eru049.

Herzig S, Shaw RJ (2018). AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19(2), 121-135. doi: 10.1038/nrm.2017.95

Hsu HY, Lin TY, Lu MK, Leng PJ, Tsao SM, Wu YC (2017) Fucoidan induces Toll-like receptor 4-regulated reactive oxygen species and promotes endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in lung cancer. *Sci. Rep.* 7, 44990. doi: 10.1038/srep44990.

Jackson JP, Lindroth AM, Cao X, Jacobsen SE (2002) Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* 416, 556-560. <https://www.nature.com/articles/nature731>.

John F, Roffler S, Wicker T, Ringli C (2011) Plant TOR signaling components. *Plant Signal. Behav.* 6(11), 1700–1705. doi: 10.4161/psb.6.11.17662.

Kim Y, Kim S, Shin Y, Hur Y, Kim W, Lee M, Cheon Ch, Verma D (2014) Ribosomal Protein S6, a Target of Rapamycin, is involved in the regulation of rRNA genes by possible epigenetic changes in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 289(7), 3901-3912. DOI 10.1074/jbc.M113.515015.

Kravchenko A, Citerne S, Jéhanno I, Bersimbaev RI, Veit B, Meyer C, Leprince A-S (2015) Mutations in the Arabidopsis Lst8 and Raptor genes encoding partners of the TOR complex, or inhibition of TOR activity decrease abscisic acid (ABA) synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 467(4), 992–997. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.028.

Laporte D, Vera J, Chandía NP, Zúñiga E, Matsuihiro B, Moenne A. (2007) Structurally- unrelated algal oligosaccharides differentially stimulate growth and defense against tobacco mosaic virus in tobacco plants. *J. Appl. Phycol* 19(1), 79-88. doi:10.1007/s10811-006-9114-y.

Lemonnier-Le Penhuizic C, Chatelet C, Kloareg B, Potin P (2001) Carrageenan oligosaccharides enhance stress-induced microspore embryogenesis

in *Brassica oleracea* var. *italica*. *Plant Sci.* 160(6), 1211-1220. doi: 10.1016/S0168-9452(01)00372-7.

Li X, Cai W, Liu Y, Li H, Fu L., Liu Z, Xu L, Liu H, Xu T, Xiong, Y (2017) Differential TOR activation and cell proliferation in *Arabidopsis* root and shoot apices. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114(10), 2765-2770. doi:10.1073/pnas.1618782114.

Li L, Sheen J, (2016) Dynamic and diverse sugar signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 33, 116–125. doi: 10.1016/j.pbi.2016.06.018.

Li HW, Zhang BS, Deng XW, Wang XP (2011) Overexpression of the trehalose-6-phosphate synthase gene *OsTPS1* enhance abiotic stress tolerance in rice. *Planta.* 234(5), 1007-1018. doi: 10.1007/s00425-011-1458-0.

Lichtenthaler HK, Wellburn AR (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.* 11(5), 591-592. doi:10.1042/bst0110591.

Liu K., Niu N, Konishi M, Wu Y, Du H, Chung H, Li, Boudsocq M, Cormack M, Maekawa S, Ishida T, Zhang Ch, Shokat K, Yanagisawa K, Sheen J (2017) Discovery of nitrate-CPK-NLP signalling in central nutrient growth networks. *Nature* 545(7654), 311–316. doi:10.1038/nature22077.

Livak K, Schmittgen, TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta C(T)) Method. *Methods.* 25(4), 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262.

Ljung K, Nemhauser JL, Perata P (2015) New mechanistic links between sugar and hormone signaling networks. *Curr. Opin. Plant Biol.* 25, 130–137. doi: 10.1016/j.pbi.2015.05.022.

Lunn JE, Feil R, Henfrikis JHM, Gibon Y, Morcuende R, Osuna D, Scheible WR, Carillo P, Hajirezaei MR, Stitt M (2006) Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADP-glucose pyrophos-

phorylase and higherrates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.* 397(1), 139-148. doi: 10.1042/BJ20060083.

Mair A, Pedrotti L, Wurzinger B, Anrather D, Simeunovic A, Weiste C, Valerio C, Dietrich K, Kirchler T, Nagele T, et al. (2015). SnRK1-triggered switch of bZIP63 dimerization mediates the low-energy response in plants. *eLife* 4(e05828), 1-33. doi: 10.7554/eLife.05828.

Mahfouz MM, Kim S, Delauney AJ, Verma DPS. 2006. *Arabidopsis* TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *Plant Cell* 18(2), 477-490. DOI:10.1105/tpc.105.035931.

Malinovsky F, Thomsen M, Nintemann S, Jagd L, Bourguine B, Burow M, Kliebenstein D (2017) An evolutionarily young defense metabolite influences the root growth of plants via the ancient TOR signaling pathway. *eLife* 6(e29353), 1-24. doi: 10.7554/eLife.29353.006.

Menand T, Desnos T, Nussaume L, Berger F, Bouchez D, Meyer C, Robaglia C (2002) Expression and disruption of the *Arabidopsis* TOR (Target of Rapamycin) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(9), 6422-6427. doi:10.1073/pnas.092141899.

Meyer P (2015) Epigenetic variation and environmental change *J. Exp. Bot.* 66(12), 3541–3548. doi:10.1093/jxb/eru502.

Moenne, A. (2016) Marine algae oligo-carrageenans (OCs) stimulate growth and defense responses in terrestrial plants. In *Research Progress in Oligosaccharins*. Springer, New York, USA.

Montané MH, Menand B (2013) ATP-competitive m 599 TOR kinase inhibitors delay plant growth by triggering early differentiation of meristem cells but not developmental patterning change. *J. Exp. Bot.* 64(14), 4361-4374. doi:10.1093/jxb/ert242.

Moreau M, Azzopardi M, Clément G, Dobrenel T, Marchive C, Renne C, Martin-Magniette M-L, Taconnat L, Renou J-P, Robaglia C, Meyer C. (2012) Mutations in the Arabidopsis homolog of LST8/GβL, a partner of the target of Rapamycin kinase, impair plant growth, flowering, and metabolic adaptation to long days. *Plant Cell* 24(2), 463–481. doi/10.1105/tpc.111.091306.

Morante-Carriel J, Sellés-Marchart S, Martínez-Márquez A, Martínez-Estesó MJ, Luque I, Bru-Martínez R (2014) RNA isolation from loquat and other recalcitrant woody plants with high quality and yield. *Anal. Biochem.* 452, 46-53. doi:10.1016/j.ab.2014.02.010.

Nukarinen E, Nägele T, Pedrotti L, Wurzinger B, Mair A, Landgraf R (2016) Quantitative phosphoproteomic reveals the role of AMPK plant ortholog snRK1as a metabolic master regulator under energy deprivation. *Sci. Rep.* 6, 31697. DOI: 10.1038/srep31697.

Nunes C, Primavesi LF, Patel MK, Martínez-Barajas E, Powers SJ, Sagar R, Fevereiro PS, Davis BG, Paul MJ (2013a) Inhibition of SnRK1 by metabolites: tissue- dependent effects and cooperative inhibition by glucose 1-phosphate in combination with trehalose 6-phosphate. *Plant Physiol. Biochem.* 63, 89-98. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.11.011.

Oh E, Zhu JY, Wang ZY (2012) Interaction between BZR1 and PIF4 integrates Brassinosteroid and environmental responses. *Nat. Cell Biol.* 14(8), 802–809. doi:10.1038/ncb2545.

Pfeiffer A, Janocha D, Dong Y, Medzihradszky A, Schöne S, Daum G, Suzuki T, Forner J, Langenecker T, Rempel E, Schmid M, Wirtz M, Hell R, Lohmann J (2016) Integration of light and metabolic signals for stem cell activation at the shoot apical meristem. *eLife* 5(e17023) 1-21. doi: 10.7554/eLife.17023.

Piatonni CV, Bustos DM, Guerrero SA, Iglesias A (2011) Nonphosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is phosphorylated in wheat endosperm at ser-404 by SnF-1-related protein kinase allosterically inhibited by ribose 5-phosphate. *Plant Physiol.* 156(3), 1337-1350.

doi: 10.1104/pp.111.177261.

Pikaard C, Scheid O (2014) Epigenetic Regulation in Plants. Cold Spring Harb Perspect Biol. 6(a019315), 1-33. doi: 10.1101/cshperspect. a019315.

Pu Y, Luo X, Bassham D (2017) TOR-Dependent and Independent Pathways Regulate Autophagy in *Arabidopsis thaliana*. Front. Plant Sci. 8(1204), 1-13. doi: 10.3389/fpls.2017.01204.

Ren M, Venglat P, Qiu S, Feng L, Cao Y, Wang E, et al. (2012) Target of Rapamycin signaling regulates metabolism, growth, and life span in *Arabidopsis*. Plant Cell 24(12), 4850-4874. doi:10.1105/tpc.112.107144.

Ren M, Qiu S, Venglat P, Xiang D, Feng L, Selvaraj G, Datla R (2011) Target of Rapamycin regulates development and ribosomal RNA expression through kinase domain in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 155(3), 1367-1382. doi:10.1104/pp.110.169045.

Rexin D, Meyer C, Robaglia C, Veit B (2015) TOR signalling in plants. Biochem. J. 470(1), 11-14. doi: 10.1042/BJ20150505.

Rodríguez-López CD, Rodríguez-Romero CA, Aguilar R, De Jiménez S (2011) Biochemical characterization of a new maize (*Zea mays* L.) peptide growth factor. Prot. Pep. Lett. 18(1), 84-91. doi:10.2174/092986611794328636.

Rojas P, Ipinza R, Molina M, Gutiérrez B (2015) Evaluación de ensayos de progenies del programa de mejoramiento de *Eucalyptus globulus* Labil. para resistencia a sequía. Ciencia e Investigación Forestal. Santiago. Chile. 21(3), 19-41. https://www.researchgate.net/publication/291357355_evaluacion_de_ensayos_

[de_progenies_del_programa_de_mejoramiento_de_eucalyptus_globulus_labil_para_resistencia_a_sequia.](#)

Ruan YL. 2014. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65(1), 33–67. doi:10.1146/annurev-plant-050213-040251.

Salem MA, Li Y, Bajdzienko K, Fisahn J, Watanabe M, Hoefgen R, Schöttler MA, Giavalisco P. (2018) RAPTOR controls developmental growth transitions by altering the hormonal and metabolic balance. *Plant Phys.* 177(2), 565–593. doi: 10.1104/pp.17.01711.

Saucedo S, Contreras RA, Moenne A (2015) Oligo-carrageenan kappa increases C, N, and S assimilation, auxin and gibberellin contents, and growth in *Pinus radiata* trees. *J. Forest. Res.* 26(3), 635-640. doi: 10.1007/s11676-015-0061-9.

Scialdone A, Mugford ST, Feike D, Skeffington A, Borrill P, Graf A, Smith AM, Howard M (2013) *Arabidopsis* plants perform arithmetic division to prevent starvation at night. *eLife.* 2(e00669), 1-24. doi: 10.7554/eLife.00669.

Schmelzle T, Hall MN (2000) TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 103(2), 253–262. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11057898>.

Schepetilnikov M, Ryabova LA (2018) Recent discoveries on the role of TOR (Target of Rapamycin) signaling in translation in plants. *Plant. Physiol.* 176(2), 1095-1105. doi: 10.1104/pp.17.01243.

Schepetilnikov M, Makarian J, Srour O, Geldreich A, Yang Z, Chicher J, Hammn P, Ryabova LA. (2017) GTPase ROP2 binds and promote activation of target of rapamycin, TOR, in response to auxin. *EMBO J.* 36(7), 886-903. Doi: 10.15252/embj.201694816.

Schepetilnikov M, Dimitrova M, Mancera-Martinez E, Geldreich A, Keller M, Ryabova LA (2013) TOR and S6K1 promote translation reinitiation of uORF-containing

mRNAs via phosphorylation of eIF3h. *EMBO J.* 32(8), 1087-1102. doi:10.1038/emboj.2013.61.

Schepetilnikov M, Kobayashi K, Geldreich A, Caranta C, Robaglia C, Keller M, Ryabova LA (2011) Viral factor TAV recruits TOR/S6K1 signalling to activate reinitiation after long ORF translation. *EMBO J.* 30(7), 1343-1356. doi:10.1038/emboj.2011.39.

Schluepmann H, Berke L, Sánchez-Perez G (2012) Metabolism control over growth: a case for trehalose-6-phosphate in plants. *J. Exp. Bot.* 63(9), 3379–3390. doi:10.1093/jxb/err311.

Schluepmann H, Van Dijken A, Aghdasi M, Wobbes B, Paul M, Sweetens S (2004) Trehalose mediate growth inhibition of Arabidopsis seedlings is due to trehalose- 6-phosphate accumulation. *Plant Physiol.* 135(2), 879-890. doi:10.1104/pp.104.039503.

Song Y, Zhao G, Zhang X, Li L, Xiong F, Zhuo F, Zhang C, Yang Z, Datla R, Ren M, et al (2017) The crosstalk between Target of Rapamycin (TOR) and Jasmonic Acid (JA) signaling existing in Arabidopsis and cotton. *Sci Rep* 7(1), 45830. doi: 10.1038/srep45830.

Sormani R, Yao L, Menand B, Ennar N, Lecampion C, Meyer C, Robaglia C (2007) *Saccharomyces cerevisiae* FKB12 binds Arabidopsis thaliana TOR and its expression in plants leads to rapamycin susceptibility. *BMC Plant Biol.* 7(1), 26. doi:10.1186/1471-2229-7-26

Van Dam TJ, Zwartkruis FJ, Bos JL, Snel B (2011) Evolution of the TOR pathway. *J. Mol. Evol.* 73(3-4), 209–220. DOI 10.1007/s00239-011-9469-9.

Vera J, Castro J, Contreras RA, González A, Moenne A (2012) Oligo-carrageenans induce a long-term and broad-range protection against pathogens in tobacco plants (var. Xanthi). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 79, 31-39. doi: 10.1016/j.pmpp.2012.03.005.

Vera J, Castro J, González A, Moenne A (2011) Seaweed polysaccharides and derive oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants. *Mar. Drugs* 9(12), 2514-2525. doi: 10.3390/md9122514.

Wang P, Zhao Y, Li Z, Tao A, Xiong J, Zhu J (2018) Reciprocal regulation of the TOR kinase and ABA receptor balances plant growth and stress response. *Mol. Cells* 69(1), 100–112. doi: 10.1016/j.molcel.2017.12.002.

Wang W, Bai MY, Wang ZY (2014) The Brassinosteroid signaling network-a paradigm of signal integration. *Curr. Opin. Plant Biol.* 21, 147–153. doi: 10.1016/j.pbi.2014.07.012.

Wu Y, Shi L, Li L, Fu L, Liu Y, Xiong Y y Sheen Y. (2019) Integration of nutrient, energy, light, and hormone signalling via TOR in plants. *J. Exp. Botany* doi:10.1093/jxb/erz028.

Wullschleger S, Loewith R, Hall MN (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124(3), 471–484. doi: 10.1016/j.cell.2006.01.016.

Wurzinger B, Nukarinen E, Nägele T, Weckwerth W, Teige M. (2018) The SnRK1 kinase as central mediator of energy signalling between different organelles. *Plant Physiol.* 176(2), 1085–1094. doi:10.1104/pp.17.01404.

Xiong Y, Sheen J (2015) Novel links in the plant TOR kinase signaling network. *Curr. Opin. Plant Biol.* 28, 83–91. doi.org/10.1016/j.pbi.2015.09.006.

Xiong Y, Sheen J. (2014) The Role of Target of Rapamycin Signaling Networks in Plant Growth and Metabolism. *Plant Physiol.* 164(2), 499–512. doi/10.1104/pp.113.229948.

Xiong Y, Sheen J. (2013) Moving beyond translation: Glucose-TOR signaling in the transcriptional control of cell cycle. *Cell Cycle* 12(13), 1989–1990. doi: 10.4161/cc.25308.

Xiong Y, Sheen J (2012) Rapamycin and glucose-target of rapamycin (TOR) protein signaling in plants. *J. Biol. Chem.* 287(4), 2836–2842. doi: 10.1074/jbc.M111.300749.

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. doi:10.1038/nature12030.

Xu, T, Dai, N, Chen J, Nagawa S, Cao M, Li H (2014) Cell surface ABP1-TMK auxin sensing complex activates ROP GTPases signaling. *Science* 343(6174), 1025–1028. doi: 10.1126/science.1245125.

Yadav UP, Ivakov A, Feil R, Duan GY, Walther D, Giavalisco P, Piques M, Carillo P, Hubberten HM, Stitt M, Lunn JE (2014) The sucrose-trehalose 6-phosphatase (Tre6P) nexus: specificity and mechanisms of sucrose signaling by Tre6P. *J. Exp. Bot.* 65(4), 1051–1068. doi:10.1093/jxb/ert457.

Zeeman SC, Kossmann J, Smith AM (2010) Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61(1), 209–234. doi:10.1146/annurev-arplant-042809-112301.

Zhang Z, Zhu J, Roh J, Sun Y, Wang W, Wang Z (2016) TOR signaling promotes accumulation of BZR1 to balance growth with carbon availability in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 26(14), 1854–1860. doi: 10.1016/j.cub.2016.05.005.

Zhang Y, Persson S, Giavalisco P (2013) Differential regulation of carbon partitioning by the central growth regulator Target of Rapamycin (TOR). *Mol. Plant* 6(6), 1731–1733. doi:10.1093/mp/sst094.

Zhang Y, Primavesi LF, Jhurrea D, Androlojc PJ, Mitchell, R.A., Powers, SJ (2009) Inhibition of SNF1-related protein kinase 1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiol.* 149(4), 1860–1871. doi/10.1104/pp.108.133934.

Zheng X, Sehgal A (2010) AKT and TOR signaling set the pace of the circadian pacemaker. *Curr. Biol.* 20(13), 1203–1208. doi: 10.1016/j.cub.2010.05.027.

Zuñiga P, Zuñiga GE, Pizarro M, Casanova A (2016) Soluble carbohydrate content variation in *Sanionia uncinata* and *Polytrichastrum alpinum*, two Antarctic mosses with contrasting desiccation capacities. *Biol. Res.* 49, 1-9. doi:10.1186/s40659-015-0058-z.

RESEÑA DE AUTORA

Apellidos y Nombres: Saucedo Aguiar Silvia Gicela

Correo: ssaucedo@uteq.edu.ec

 **Orcid:** 0000-0002-8707-2175



FORMACIÓN ACADÉMICA:

- Ingeniera Agrónoma
- Especialista en Biotecnología
- Magister en Biotecnología
- Doctora en Biotecnología
- Participación en cursos de actualización y perfeccionamiento
- Autora y Coautor de publicaciones científicas

EXPERIENCIA LABORAL:

- Investigador del Laboratorio de Biotecnología - UTEQ
- Director del Laboratorio de Biotecnología - UTEQ
- Docente Titular Principal – UTEQ
- Docente de Posgrado - UTEQ
- Docente contratada – UTB (3 años)



Ing. Yenny Guiselli Torres Navarrete, PhD.
RECTORA

Dr. Eduardo Díaz Ocampo, PhD.
VICERRECTOR ACADÉMICO

Ing. Sonnia Esther Barzola Miranda, PhD.
VICERRECTORA ADMINISTRATIVA

Econ. Carlos Edison Zambrano, Ph.D.
DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN - DICYT

Eucalyptus globulus es una especie originaria de Australia, de rápido crecimiento y de gran interés comercial. Inicialmente, se demostró que los OCs estimulan el crecimiento y las respuestas de defensa en *E. globulus*, principalmente OC kappa.

En este trabajo se analizó si OC kappa estimula el crecimiento de *E. globulus* por aumento de los niveles de glucosa, trehalosa y TOR-P lo cual conduce a aumentos de la expresión de genes de proteínas involucradas en la fotosíntesis y de enzimas del metabolismo primario y secundario.

