UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas

Participación de la proteína TOR en la interacción *Azospirillum brasilense* Sp245-*Arabidopsis thaliana*

Tesis que presenta el:

MC Manuel Méndez Gómez

Para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias en Biología Experimental

Asesor:

DC Ernesto García Pineda

Morelia, Michoacán, Julio 2020

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS UMSNH

DRA. ESPERANZA MELÉNDEZ HERRERA
COORDINADORA GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Participación de la proteína TOR en la interacción *Azospirillum brasilense* Sp245-*Arabidopsis thaliana*" presentado por el M.C MANUEL MÉNDEZ GÓMEZ con matrícula No. 0680771H, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Doctor en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Morelia, Mich., a 22 de mayo de 2020

MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA

Dr. Ernesto García Pineda
Director de Tesis

Dr. Saúl Freire Velazquez
Vocal

Dr. Eduardo Valencia Cantero
Vocal

Dr. José López Bucio
Vocal

Dr. Gustavo Santoyo Pizano
Vocal

c.c.p. Archivo de la O BE

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE PLANTAS DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA ASESORÍA DEL DC. ERNESTO GARCÍA PINEDA. EL TRABAJO FUE APOYADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) (No. DE BECA: 276783)

CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

AGRADECIMIENTO

A Dios por todo

A mis padres, Manuel Méndez Hernández y Gerónima Gómez Hernández por darme la vida, por los consejos, por qué nunca me han dejado solo y por todo lo que ellos dejaron de disfrutar por cuidarme y apoyarme en mis estudios, por todo todo todo todo, infinitamente gracias, aunque uno de ellos ya no esté físicamente, estará siempre conmigo.

A mis hermanos, Alfredo, Teresa, Aurora, Cecilia, Ana, Laureano y Anahí, por todo el apoyo económico, emocional y por sus consejos acertados que me han brindado.

A mis hijos, Leo y Dany, que son mi motor y me impulsan a seguir a pesar de todas las adversidades. Los amo….

A Monce, por su compañía, cariño y por su gran apoyo en todo desde que nos conocimos. Tkm.

A la familia Moreno-Franco, por todo el apoyo incondicional. Muchas gracias.

Al DC Ernesto García Pineda y a la MC Elda Castro Mercado, por aceptarme en el laboratorio, por su asesoría, paciencia, consejos, por enseñarme a luchar por las cosas que uno quiere, por todo, y no encuentro más palabras, más que sinceramente mil gracias.

A mis sinodales, al DC José López Bucio, DC Gustavo Santoyo Pizano, DC Eduardo Valencia Cantero, y DC Saúl Fraire Velázquez, por su valioso tiempo, paciencia y por las observaciones muy acertadas durante el desarrollo de mi trabajo. Muchas gracias.

Al DC José López Bucio por facilitarme las semillas de *Arabidopsis thaliana* y permitirme trabajar en su laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio, (el orden no indica la importancia de la persona), Jhana, Iñaki, Ismael, Arturo, Fany, Juan pablo, Celia, Narmi, Laura, el Güero, Marisol, Luis M, Citilla, Aimé, Jesús y otros más, a todos ellos muchas gracias por su amistad, por los momentos de alegría y por su compañía, Gracias.

A mis compañeros, del laboratorio de Fisiología vegetal, (el orden no indica la importancia de la persona) a Ramón, Lupis, Gus, Chava, Marina, Pedrini, Carlitos, Jano, Chari, Lichi, Kirán, gracias por su valiosa amistad y por el apoyo en algunos experimentos.

A mis compañeros de generación, Dany, Marina, Gladys, Víctor, Karen, por su valiosa amistad, sinceramente gracias.

Al DC Homero Reyes de la Cruz por el apoyo y por permitirme realizar algunos experimentos en su laboratorio.

Al MC Omar y al DC Cesar, integrantes del laboratorio Biotecnología Molecular de Plantas, por el apoyo técnico durante el desarrollo de algunos experimentos. Gracias.

Al DC Benoît Menand, a la DC Jen Sheen y a la DC Rossana Henriques por las semillas de *Arabidopsis thaliana TOR/tor*, *Tor-es1* y *S6K1/2* respectivamente.

A los trabajadores de la secretaria académica por la orientación, facilidad en los tramites.

Al Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas y a la UMSNH por aceptarme en sus aulas.

A CONACYT por la beca (No. 276783) proporcionada para mi manutención durante el desarrollo de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN 1
2. INTRODUCCIÓN 5
3. ANTECEDENTES 7
3.1 Interacción planta-microorganismo 7
3.2 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) 7
3.3 El género *Azospirillum* 8
3.4 Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal 9
3.4.1 Fijación de nitrógeno 9
3.4.2 Producción de fitohormonas 9
3.4.3 Óxido nítrico 12
3.4.4 Lipopolisacáridos 12
3.4.5 Inducción de resistencia a patógenos y estrés abiótico 12
4. Fitohormonas en la interacción planta-microorganismo 13
5. Fitohormonas en el crecimiento vegetal 13
5.1 Auxinas 14
5.2 Citocininas 16
5.3 Etileno 18
5.4 Otras fitohormonas 19
6. Interacción fitohormonas-Target of Rapamycin (TOR) 20
7. TOR en mamíferos 20
7.1 Ruta de señalización de TOR en mamíferos 22
7.2 TOR en enfermedades humanas 24
8. TOR en plantas 26
8.1 Función de TOR en el crecimiento y desarrollo vegetal 27
8.2 Ruta de señalización de TOR en plantas 29
8.2.1 Componentes arriba de la ruta de TOR 29
8.2.2 Componentes debajo de la ruta de TOR 31
8.3 TOR en interacción planta-microorganismo 34
9. JUSTIFICACIÓN 38
10. HIPÓTESIS 39
11. OBJETIVOS 39
11.1 Objetivo general 39
11.1.1 Objetivos particulares 39

12. RESULTADOS 40

12.1 Capítulo 1. TARGET OF RAPAMYCIN signaling plays a role in *Arabidopsis* growth promotion by *Azospirillum brasilense* Sp245 41

12.2 Capítulo 2. Phytostimulation and root architecture reconfiguration by *Azospirillum brasilense* Sp245 in *Arabidopsis* on different interaction systems involve elements in the auxin and ethylene signaling pathways 53

12.3 Capítulo 3. *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharides induce Target of Rapamycin signaling and growth in *Arabidopsis thaliana* 87

12.4 Capítulo 4. Resultados adicionales 110

13. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES 115

14. LITERATURA CITADA 123

15. ADENDA 135

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Percepción y ruta de señalización de las auxinas 15
Figura 2. Percepción y ruta de señalización de las citocininas..... 17
Figura 3. Percepción y ruta de señalización del etileno..... 18
Figura 4. Complejos de la proteína TOR y su ruta de señalización en mamíferos24
Figura 5. Ruta de señalización de TOR en plantas 34

1. RESUMEN

El género *Azospirillum* pertenece al grupo de las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR; **P**lant **G**rowth **P**romoting **R**hizobacteria) y se utiliza comercialmente como un biofertilizante en diversos cultivos. Promueve el crecimiento vegetal principalmente por la producción de fitohormonas como las auxinas. Las fitohormonas controlan el crecimiento vegetal a expensas de la disponibilidad de nutrientes en la planta. La proteína TOR (**T**arget **O**f **R**apamycin) es una proteína cinasa que controla varios procesos de crecimiento y desarrollo en animales y plantas, en respuestas a factores de crecimiento y nutrientes. La función de TOR en las interacciones planta-rizobacteria es poco conocida. En este trabajo se analizó el efecto de *Azospirillum brasilense* Sp245 sobre el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* y la participación de la proteína TOR durante la interacción. Para analizar su efecto sobre el crecimiento vegetal se establecieron tres sistemas de interacción: 1) contacto directo, 2) producción de compuestos difusible, y 3) producción de compuestos volátiles, producidos por la rizobacteria. En las tres interacciones, *A. brasilense* incrementó el peso fresco, la formación de raíces laterales y pelos radiculares de las plántulas de *Arabidopsis*. Sin embargo, la longitud de la raíz principal fue afectada de manera diferencial, en concordancia con cambios en la división y diferenciación celular en el meristemo. Mediante el uso de mutantes afectadas en la percepción y señalización de las auxinas, citocininas y etileno, se demostró que las rutas de señales de las auxinas y citocininas son necesarias para la formación de raíces laterales, mientras que la formación de los pelos radiculares requirió de las rutas de señales de las auxinas, etileno y citocininas. Finalmente, el desarrollo del follaje parece depender principalmente del efecto de las citocininas.

Por otro lado, empleando la línea transgénica de *Arabidopsis TOR:GUS*, se observó que TOR se expresa principalmente en los meristemos de la raíz primaria, raíces laterales y en las hojas en desarrollo. Su expresión se incrementó en presencia de *A. brasilense* a los 1, 3 y 6 días después de la inoculación. La expresión correlacionó con un incremento en la fosforilación de la proteína S6K, el blanco directo de TOR.

La promoción del crecimiento vegetal y la fosforilación de S6K disminuyeron en presencia del inhibidor de TOR, AZD-8055, confirmando la participación de TOR durante la interacción. Para determinar si las auxinas o los lipopolisacáridos (LPS) de *A. brasilense* están involucradas en la estimulación de la actividad de TOR durante la interacción, se empleó la mutante FAJ0009, la cual está dañada en la biosíntesis de ácido indol acético (AIA) y LPS extraídos de la rizobacteria. La mutante FAJ0009 estimuló ligeramente la expresión de TOR en el meristemo de la raíz principal, en comparación con la cepa silvestre, indicando que las auxinas tienen un papel en la estimulación de la actividad de TOR. Además, los LPS estimularon el crecimiento y el desarrollo vegetal, así como la expresión y la actividad de TOR. Considerados en conjunto, los resultados sugieren que las fitohormonas y TOR coordinan el crecimiento y desarrollo vegetal estimulado por esta rizobacteria. También sugieren que las plantas son capaces de reconocer componentes estructurales de la rizobacteria, como los LPS, para estimular la actividad de TOR, lo que refleja la complejidad de la interacción *Azospirillum-Arabidopsis*.

Palabras clave: Rizobacteria, *Azospirillum brasilense*, *Arabidopsis thaliana*, Fitohormonas, Target Of Rapamycin, Lipopolisacáridos, Crecimiento y desarrollo vegetal.

SUMMARY

The genus *Azospirillum* belongs to the group of **P**lant **G**rowth **P**romoting **R**hizobactreria (PGPR) and promotes plant growth mainly through the production of auxins. The hormonal signaling interacts with nutritional signaling to control plant growth. The TOR (**T**arget **O**f **R**apamycin) protein is a protein kinase that controls various growth and development processes in plants and mammals in response to growth factors and nutrients. However, the role of TOR in plant-rhizobacteria interactions is mostly unknown. In this work, the effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 on the growth of *Arabidopsis thaliana* and the role of TOR protein during the interaction was analyzed. To analyze the effect on plant growth, three interaction systems were established: 1) direct contact, 2) diffusible, and 3) volatile compounds produced by the rhizobacteria. In all interactions, *A. brasilense* increased fresh weight, lateral root formation, and root hairs in *Arabidopsis* seedlings. However, the length of the main root was affected differently, concomitant with changes in cell division and differentiation in the root meristem. Furthermore, through the use of mutant plants, the signaling by auxins, cytokinins and ethylene was required to promote plant growth.

On the other hand, using the *Arabidopsis TOR:GUS* transgenic line, an increase in TOR expression was observed 1, 3, and 6 days after the inoculation with *A. brasilense*. The expression correlated with an increase in the phosphorylation of S6K protein, a direct target of TOR. The promotion of plant growth and the phosphorylation of S6K decreased in the presence of AZD-8055, a TOR inhibitor, which confirm the participation of TOR during the interaction. To determine whether the auxins or lipopolysaccharides (LPS) of *A. brasilense* are involved in the stimulation of TOR activity during the interaction, the mutant FAJ0009, impaired in the AIA biosynthesis, and the LPS extracted of the rhizobacterium were used. The FAJ0009 mutant slightly stimulated TOR expression in meristems, in comparison with the wild type, suggesting that the auxins have a role in the stimulation of TOR activity. Furthermore, the LPS promoted plant growth and development, as well as TOR activity. Taken together, our results suggest that phytohormones and TOR

coordinate the growth and development stimulated by the rhizobacterium, and reveal the complexity of the *Azospirillum-Arabidopsis* interaction.

Key words: Rhizobacteria, *Azospirillum brasilense*, *Arabidopsis thaliana*, Phytohormones, Target Of Rapamycin, Lipopolysaccharides, Plant growth and development.

2. INTRODUCCIÓN

La rizósfera es una porción del suelo que rodea la raíz de una planta y es una zona importante para la interacción planta-microorganismo. En ella se albergan diversos microorganismos ya sean patógenos o benéficos. Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR; **P**lant **G**rowth **P**romoting **R**hizobacteria) son bacterias que tienen la capacidad de mejorar el crecimiento de las plantas a través de mecanismos directos (p. ej.: Fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas, producción de sideróforos, solubilización de nutrientes) o indirectos (p. ej.: competencia con bacterias patógenas, inducción respuestas de defensa, biocontrol). Además, las PGPR tienen la capacidad de producir compuestos volátiles para estimular el crecimiento y desarrollo vegetal (Vacheron et al., 2013; Mendes et al., 2017). La rizobacteria *Azospirillum,* una de las PGPR más conocidas, tiene la capacidad de promover el crecimiento de las plantas a través de la producción de fitohormonas, principalmente auxinas. Se ha demostrado que las auxinas producidas por esta rizobacteria juegan un papel como moléculas de señalización durante la asociación con las raíces (Spaepen et al., 2014). Las auxinas, que también son producidas por las plantas, regulan varios aspectos durante el ciclo de vida de ellas (Overvoorde et al., 2010).

Además de las fitohormonas, el crecimiento vegetal también depende de la disponibilidad de nutrientes. Estudios recientes han indicado que la señalización hormonal interactúa con la señalización nutricional, mediada por la proteína **T**arget **O**f **R**apamycin (TOR), para regular el crecimiento vegetal. TOR es una proteína cinasa conservada en todos los organismos; regula el crecimiento y desarrollo en respuesta a factores de crecimiento y nutrientes (Xiong & Sheen, 2014; Saxton & Sabatini, 2017). Actualmente se sabe que las auxinas activan a la proteína TOR, mediante la participación de la proteína ROP2 para regular la traducción de RNAs mensajeros y la división celular en los meristemos, siempre en presencia de una fuente de energía como la glucosa (Li et al., 2017; Schepetilnikov et al., 2017). No obstante, el mecanismo molecular por el que TOR controla el crecimiento vegetal ante factores bióticos como los microorganismos, apenas se está comenzando a

dilucidar. Reportes recientes muestran que la proteína TOR está implicada en la formación de nódulos estimulados por *Rhizobium tropici*, y actúa como un regulador negativo de las respuestas de defensa vegetal (Nanjareddy et al., 2016; De Vleesschauwer et al., 2017).

En este trabajo se analizó la participación y el papel de la proteína TOR en la promoción del crecimiento vegetal promovido por la rizobacteria *Azospirillum brasilense* Sp245. Para ello, se establecieron tres sistemas de interacción que contemplaron la interacción directa planta-rizobacteria, la producción de compuestos difusibles y de compuestos volátiles por la rizobacteria. Los resultados obtenidos indicaron que los compuestos difusibles y volátiles de la rizobacteria promueven el crecimiento vegetal involucrando a la señalización de las auxinas, citocininas y etileno. También que la promoción del crecimiento vegetal depende de la proteína TOR. Las auxinas producidas por *Azospirillum* y los lipopolisacáridos de la pared celular jugaron un papel activo en la estimulación de TOR durante la interacción.

3. ANTECEDENTES

3.1 Interacción planta-microorganismo

Las plantas son organismos autótrofos con capacidad de fijar el CO_2 atmosférico, y representan la mayor fuente de carbono, nitrógeno y energía para los microorganismos heterótrofos (Badri et al., 2009). Interactúan constantemente con una gran diversidad de microorganismos que conforman su microbiota vegetal. Los microorganismos más abundantes en la microbiota vegetal son las bacterias, y comunidades de hongos, oomicetos, algas, protozoos, nematodos y virus también están presentes de manera importante. La microbiota bacteriana asociada a las plantas está constituida principalmente por los filos Proteobacterias, Actinobacterias, Bacteroidestes y Firmicutes (Müller et al., 2016). Los miembros de estos filos compiten para colonizar diferentes especies vegetales en varias condiciones ambientales. Todos estos microorganismos ejercen efectos que pueden ser positivos o negativos para el crecimiento y desarrollo vegetal. La rizósfera, una zona que rodea el sistema radicular, posee la mayor diversidad de microorganismos (principalmente Proteobacterias) y es por lo tanto donde se llevan a cabo interacciones complejas (Philippot et al., 2013; Müller et al., 2016). Éstas incluyen interacciones con bacterias patógenas y asociaciones mutualistas con microbios benéficos, tales como micorrizas y PGPR (Mendes et al., 2017).

3.2 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)

Los microorganismos que colonizan la rizósfera, pueden ser patógenos, mientras que otros tienen efectos neutros o benéficos. Entre los que habitan en la rizósfera se encuentra un grupo conocido como PGPR, con capacidad de promover el crecimiento vegetal. Diversas PGPR promueven el crecimiento de las plantas directamente a través de la producción y secreción de sustancias como las auxinas, citocininas y giberelinas, suplementación de macro y micro elementos, la fijación

biológica de nitrógeno (diazótrofos) y/o solubilización del fosfato, entre otros. Algunos liberan compuestos volátiles como el 2,3-butanediol y acetoina. Las rizobacterias también benefician a través de mecanismos indirectos, que son principalmente asociados con la reducción del daño causado por patógenos, debido a la activación de la resistencia sistémica inducida, producción de antibióticos y por la competencia por los nutrientes y nichos ecológicos (Van Loon et al., 2006; Lugtenberg & Kamilova, 2009; Saharan & Nehra, 2011; Vacheron et al., 2013; Backer et al., 2018).

Entre las PGPRs se encuentran géneros como *Rhizobium*, *Pseudomonas, Azospirillum, Azotobacter, Klebsiella, Enterobacter, Alcaligenes, Arthrobacter, Burkholderia, Bacillus* y *Serratia* (Saharan & Nehra, 2011; Backer et al., 2018). Algunos actualmente se están comercializando como inoculantes de biocontrol y biofertilizantes para mejorar el rendimiento del cultivo en campo, y así, reducir la contaminación y los gastos por fertilizantes. Un ejemplo es la aplicación de biofertilizantes a base de *A. brasilense* en cultivos de importancia económica como el maíz, trigo y sorgo para mejorar el rendimiento. *Azospirillum* posee muchas cualidades para ser considerado como PGPR y es uno de los biofertilizantes más usados (Cassan & Diaz-Zorita, 2016). Por lo tanto, describiremos a continuación algunos aspectos de este género.

3.3 El género *Azospirillum*

Azospirillum pertenece a la subclase α-proteobacteria, que alberga un gran número de bacterias simbiontes. Se han aislado en todo el mundo colonizando la rizósfera de gramíneas, y otros cultivos de importancia económica como el maíz, trigo y arroz (Patriquin et al., 1983). Este género fue estudiado primero por J. Döbereiner por su capacidad de fijar el nitrógeno y su gran presencia en la rizósfera (revisado por Baldani & Baldani, 2005). En la actualidad se han encontrado muchas especies del género. Las dos primeras en ser descritas fueron *A. lipoferum* y *A. brasilense* (Tarrand et al., 1978), siendo estas las más estudiadas.

Los miembros de este género son bastones curvados de un tamaño aprox. de 0.8-1.0 X 25 µM, pertenecen al grupo de las Gram-negativas, móviles con un simple flagelo polar. Se han observado numerosos flagelos laterales cortos en *A. lipoferum* y *A. brasilense* (Hartmann & Baldani, 2006). Se encuentran en grandes cantidades (hasta 10^7 Unidades Formadora de Colonias (UFC)/g de suelo) en la rizósfera, asociadas a raíz, tallos y hojas desde zonas tropicales, subtropicales y templadas (Hartmann & Baldani, 2006). Las plantas inoculadas con *Azospirillum* presentan un incremento en el número de raíces laterales, más pelos radiculares e incremento en peso seco de la raíz (Hadas & Okon, 1987; Spaepen et al., 2008).

3.4 Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal

3.4.1 Fijación de nitrógeno

Originalmente la fijación de nitrógeno fue propuesta como el principal mecanismo por el cual *Azospirillum* afecta el crecimiento de las plantas (Okon et al., 1983), ya que posee la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico. *A. brasilense* posee el operón *nifHDK*, que codifica genes que participan en la fijación y asimilación del nitrógeno (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). A paesar de ello, en la mayoría de los cultivos bajo diferentes condiciones, su contribución en la fijación del nitrógeno se ha estimado en no más de 10 kg de N_2 por hectárea al año, mientras que la fertilización del maíz en la agricultura moderna está en el orden de 200-300 kg de N_2 por hectárea. De acuerdo con lo anterior, parece que su contribución en la fijación biológica de nitrógeno es baja para los cultivos y que no juega un papel muy importante en la promoción del crecimiento vegetal (Bashan & De-Bashan, 2010).

3.4.2 Producción de fitohormonas

Además de la fijación de nitrógeno, la promoción del crecimiento vegetal por la inoculación podría ser explicada por la acción de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal producidas por ésta rizobacteria. Se han identificado varios tipos de fitohormonas en el cultivo bacteriano (Tien et al., 1979; Spaepen et al.,

2008). El ácido indol acético (AIA) es la principal auxina producida por *Azospirillum* y se han descrito numerosas vías para su síntesis (Spaepen & Vanderleyden, 2011). Sintetiza esta hormona vía indol-3-piruvato dependiente del triptófano (Spaepen & Vanderleyden, 2011), siendo la indol-3-piruvato descarboxilasa (codificada por el gen *ipdC*), una enzima clave para su síntesis (Vande Broek et al., 1999). También se ha descrito una vía independiente de triptófano, esta vía es predominante cuando no se adiciona triptófano al medio de cultivo (Spaepen & Vanderleyden, 2011), sin embargo, no se han identificado las enzimas involucradas en esta vía.

El papel central del AIA producido por *Azospirillum* en la proliferación del sistema radical; se demostró con una cepa mutante que produce sólo el 10% del AIA, comparado con la cepa silvestre, y que tiene un efecto estimulatorio reducido en el crecimiento vegetal (Dobbelaere et al., 1999). Cuando las plantas son inoculadas con *Azospirillum* presentan mayor crecimiento vegetativo, y mayor número de raíces laterales y pelos radiculares. Además, las auxinas también actúan como moléculas de señalización durante la interacción planta-bacteria. Esto se ha demostrado por Spaepen et al., (2014), en donde plantas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas con *A. brasilense* Sp245 cepa silvestre, inducen cambios en la expresión de genes relacionados a defensa y a la pared celular, mientras que la inoculación con una mutante afectada en la síntesis del AIA no induce estos cambios.

Azospirillum, también tiene la capacidad de producir otros reguladores de crecimiento vegetal, a una concentración suficiente para provocar cambios morfológicos y fisiológicos. En este sentido se ha reportado que *A. lipoferum* tiene la capacidad de producir giberelinas en medios de cultivo químicamente definido, como ocurre con otras PGPR (Bottini et al., 2004).

El ácido abscísico (ABA), conocido como una molécula de estrés debido a que se incrementa cuando la planta está en una situación de estrés abiótico, también se ha encontrado en este género. La inoculación con *A. lipoferum* revierte el efecto de fluoridona que afecta la síntesis del ABA en plántulas de maíz, sugiriendo que esta bacteria puede producir este tipo de hormona (revisado por Bottini et al., 2004). También se demostró que *A. brasilense* Sp245 produce ABA en el medio de cultivo

y que esta producción se incrementa cuando el NaCl (100 mM) es incorporado al medio (Cohen et al., 2008). En este mismo trabajo, la inoculación de *A. thaliana* con *A. brasilense* Sp245 incrementó dos veces la cantidad de ABA en la planta. Estos trabajos nos dan una idea de cómo este género mejora el crecimiento vegetal en condiciones de estrés a través de producir e inducir la síntesis de ABA.

La mayoría de los microorganismos rizosféricos son capaces de sintetizar citocininas en cultivos. Los estudios sobre la ruta de síntesis de esta molécula en *Azospirillum* son escasos, pero se han encontrado citocininas en sus cultivos que estimulan el crecimiento vegetal (Tien et al., 1979). Además, en presencia de diferentes fuentes de carbono sintetizan moléculas semejantes a citocininas (Strzelczyk et al., 1994). Esto abre un nuevo campo de investigación para conocer cómo estas bacterias pueden producir moléculas tipo citocininas y como se afecta la arquitectura del sistema radical.

El etileno es otra fitohormona que regula varios procesos biológicos. La enzima que sintetiza esta hormona no se ha encontrado en el género *Azospirillum*, pero, se ha observado que si pueden producir etileno. Strzelczyk et al. (1994) analizaron la capacidad de este género para producir esta molécula, y encontraron que pueden sintetizar etileno bajo diferentes fuentes de carbono y en presencia de metionina en el medio. En otro estudio, el efecto de la aplicación exógena de etileno a la planta fue similar al efecto de la inoculación, y la aplicación de inhibidores de la actividad o síntesis del etileno bloquea completamente la promoción del crecimiento vegetal inducido por *A. brasilense* (Ribaudo et al., 2006). Si bien, no hay estudios claros sobre la síntesis de etileno en *Azospirillum*, no se descarta que la promoción del crecimiento vegetal también sea por etileno, o incluso la combinación de todas las fitohormonas. Por otro lado, diversas bacterias incluyendo a *Azospirillum* producen ACC deaminasa, una enzima que degrada el precursor (ACC) del etileno. (Li et al., 2005; Nascimiento et al., 2014). La actividad de esta enzima reduce los niveles de etileno en la planta en condiciones de estrés y promueve el crecimiento vegetal (Orozco-Mosqueda et al., 2020).

3.4.3 Óxido nítrico

El óxido nítrico (ON) es un radical libre gaseoso considerado como una especie reactiva de oxígeno (ERO) que ha evolucionado como una molécula de señalización en muchos procesos fisiológicos en animales. De manera similar, en plantas, el ON actúa como una molécula de señalización que regula el desarrollo vegetal y la respuesta a factores bióticos y abióticos (Domingos et al., 2015). Es un componente que se requiere en la señalización de la auxinas para regular la formación de raíces laterales en tomate (Correa-Aragunde et al., 2004). Existen reportes que demuestran que *A. brasilense* Sp245 es capaz de producirlo a través de diferentes vías en condiciones aeróbicas. En plántulas de tomate, la formación de raíces laterales depende de la producción de ON por esta rizobacteria e independientemente de la producción del AIA (Correa-Aragunde et al., 2004; Molina-favero et al., 2008). Se requieren más estudios para conocer el papel del ON en la promoción de crecimiento vegetal y en la interacción planta-bacteria.

3.4.4 Lipopolisacáridos

Los lipopolisacáridos (LPS) son componentes de la membrana exterior de las bacterias Gram negativas, consideradas como patrones moleculares asociados a microbios (MAMP; **M**icrobe-**A**ssociated **M**olecular **P**atterns) (Silhavy et al., 2010; Ranf et al., 2015). Recientemente, se ha reportado que los componentes de la pared celular de *Azospirillum,* principalmente los lipopolisacáridos, son capaces de inducir la división celular en el meristemo de la raíz e inducir respuestas bioquímicas para controlar el ciclo de vida en trigo (Evseeva et al., 2011; Vallejo-ochoa et al., 2017; Chávez et al., 2018). Sin embargo, la señalización activada por los LPS para regular el crecimiento vegetal es ampliamente desconocida.

3.4.5 Inducción de resistencia a patógenos y estrés abiótico

A. brasilense estimula la inducción de resistencia en tomate en contra de la bacteria patógena *Pseudomonas syringea* pv. *Tomato* (Bashan & De-Bashan, 2002). Plantas

de *Oryza sativa* cv. *Nipponbare* inoculadas con *Azospirillum* B510 exhiben un incremento en la resistencia en contra del hongo *Magnaporthe oryzae* y de la bacteria *Xanthomonas oryzae*, a través de la activación de un mecanismo de defensa independiente de la señalización por ácido salicílico (Yasuda et al., 2009). Aunque *Azospirillum* no es bien reconocida como un agente de biocontrol típico, algunos aislados producen compuestos como el ácido fenilacético y sideróforos, que inhiben el crecimiento de bacterias como *A. tumefaciens*, *E. carotovora*, *P. syringae*, *E. coli* y de hongos como *C. acutatum*, *F. oxysporum*, *A. brassicicola* y *N. crassa* (Somers et al., 2005; Tortora et al., 2011).

4. Fitohormonas en la interacción planta-microorganismo

La mayoría de las PGPRs tienen la capacidad de producir hormonas reguladoras del crecimiento vegetal. La importancia de las fitohormonas en la interacción planta-microorganismo se ha demostrado por experimentos donde la inoculación con PGPR causa cambios en la expresión de genes relacionados a hormonas. Por lo tanto, los cambios en el crecimiento vegetal resultan de la interferencia de las PGPR con las vías hormonales involucradas en el desarrollo vegetal como las auxinas, citocininas, etileno, giberelinas y ácido abscísico. Además, algunas rizobacterias modifican el status hormonal de la planta y este cambio afecta la arquitectura de la raíz, el desarrollo de hojas y el consumo de nutrientes (Dodd et al., 2010; Vacheron et al., 2013; Kudoyarova et al., 2019).

5. Fitohormonas en el crecimiento vegetal

La mayoría de los estudios sobre el papel de las fitohormonas en el desarrollo vegetal se han realizado en la planta *A. thaliana*. Esta planta posee una serie de características que la hacen un buen modelo de estudio. Son de tamaño pequeño, ciclo de vida corto de 6-8 semanas, alta fecundidad produciendo una gran cantidad

de semilla, facilidad de crecer *in vitro*, genoma secuenciado y actualmente podemos encontrar una amplia colección de mutantes y líneas transgénicas para estudiar diferentes rutas de señalización que controlan programas de crecimiento y desarrollo vegetal (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Van-Norman & Benfey, 2009; Krämer, 2015).

5.1 Auxinas

La palabra “auxina”, del griego “*auxein*”, significa “aumentar” o “crecer”, ya que promueve la elongación de los coleoptilos (Taiz & Zeiger, 2003). La auxina más común en su forma natural es el ácido indol-3-acetico (AIA), no obstante, existen otras moléculas que se encuentran de forma natural o sintéticas que pueden inducir respuestas a auxinas (Korasick et al., 2013). Las auxinas, son sintetizadas en hojas (las hojas jóvenes tienen una alta capacidad de biosíntesis), cotiledones y raíces (Ljung et al., 2001). La ruta de biosíntesis de las auxinas principalmente del AIA en plantas, es compleja, sin embargo, se han postulado dos grandes rutas: la ruta independiente y dependiente del triptófano. Se sugiere que el indol-3-glicerol fosfato es probablemente el precursor en la ruta independiente del triptófano, pero no se conoce como es que da lugar al AIA. A su vez, dentro de la ruta dependiente del triptófano, se han postulado varias vías: 1) la vía del indol-3-acetamida (IAM); 2) la vía del ácido indol-3-pirúvico IPA); 3) la vía del triptamina (TAM); y 4) la vía del indol-3-acetaldoxima (IAOX). Diversos autores sugieren que la vía IPA es el principal contribuidor del AIA en las plantas (Woodward & Bartel, 2005; Zhao, 2010; Mano & Nemoto, 2012; Korasick et al., 2013). Una vez sintetizadas, las auxinas son transportadas a diferentes sitios de la planta. En *Arabidopsis*, la distribución de las auxinas se lleva a cabo a través de mecanismos de trasporte polar de influjo (proteínas de la familia AUX1/LAX) y de eflujo (trasportadores PIN y familia de trasportadores) (Petrasek & Friml, 2009). Por lo tanto, muchos aspectos de la acción de las auxinas dependen de su distribución diferencial dentro del tejido vegetal. Consecuentemente, las células deben de tener la capacidad de interpretar los diferentes niveles de auxinas celulares para regular diferentes procesos de desarrollo. Muchas de las respuestas celulares estimuladas por los diferentes

niveles de auxinas son reguladas por una vía simple que desemboca en la regulación de la transcripción de diversos genes (Vanneste & Friml, 2009; Leyser, 2018). La percepción y señalización de las auxinas en las células es mediada por diferentes receptores, a pesar de ello, los más estudiados involucran al complejo receptor $SCF^{TIR1/AFB}$-Aux/IAA (Santner et al., 2009; Salehin et al., 2015; Strader & Zhao, 2016; Leyser, 2018) (**Figura 1**).

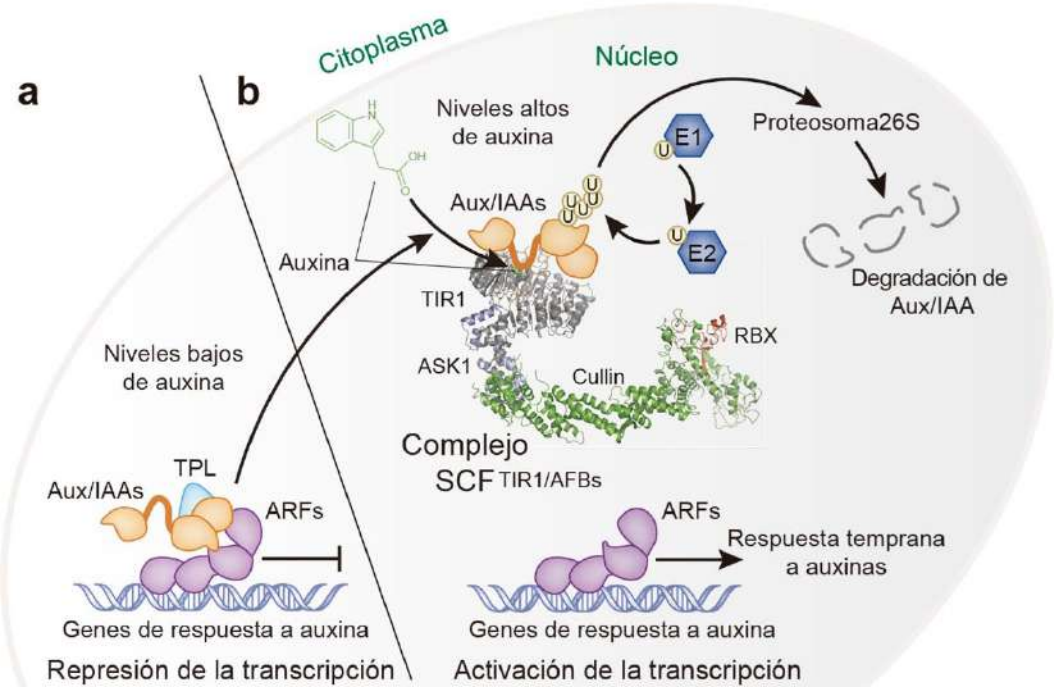


Figura 1. Percepción y ruta de señalización de las auxinas. La señalización mediada por el complejo $SCF^{TIR1/AFB}$-Aux/IAA requiere de las proteínas TIR/AFB F-box, los represores transcripcionales Aux/IAA y los factores de respuesta a axinas (ARFs). **a**). Niveles bajos de auxinas. **b**). Niveles altos de auxina. Durante la percepción y señalización, las auxinas actúan como un gancho molecular que permite la unión las proteínas Aux/IAA al complejo ubiquitina ligasa E3 llamada $SCF^{TIR1/AFB}$, y esta unión resulta en la degradación del represor Aux/IAA y en la activación de los ARFs, controlando así la transcripción de genes de respuesta a auxinas (Modificado de Santner et al., 2009).

Las auxinas son reguladores claves de muchos aspectos del crecimiento y desarrollo vegetal, como la división y elongación celular, diferenciación, tropismo, dominancia apical, senescencia, abscisión, y floración (WOODWARD & BARTEL, 2005; Vanneste & Friml, 2009). Mutaciones en los componentes de señalización de las auxinas resultan en un defectuoso crecimiento vegetal. Se ha reportado que las

auxinas controlan el funcionamiento de los meristemos tanto de la parte aérea y de la raíz, así regulando la formación de nuevas hojas y la formación de raíces laterales y pelos radiculares en la raíz. Particularmente en los meristemos, las auxinas antagonizan con otras fitohormonas como las citocininas para controlar la actividad meristemática (Dello Ioio et al., 2007, 2008; Overvoorde et al., 2010; Vernoux et al., 2010; Su et al., 2011; Schaller et al., 2015).

5.2 Citocininas

Las citocininas son moléculas derivadas de la adenina, que llevan cadenas laterales de isoprenoides en la posición N^6 del anillo de adenina (Sakakibara, 2005; Kieber & Schaller, 2018). Las de mayor presencia en las plantas son las zeatinas, que están presente en su configuración *trans* y *cis,* siendo *trans* la forma más activa. Su síntesis se lleva a cabo tanto en la raíz como en el follaje y depende inicialmente de la enzima isopentenil transferasa (IPT). Son transportadas hacia otros sitios mediante mecanismos poco conocidos. Al igual que otras fitohormonas, los niveles de las citocininas dependen de la síntesis y metabolismo, además, se ha probado que otras fitohormonas como las auxinas y ABA regulan la expresión de genes que participan en su biosíntesis (Hutchison & Kieber, 2002; Sakakibara, 2005). Una vez sintetizadas y transportadas, son percibidas por receptores tipo proteína histidina cinasa que se encuentran en la membrana celular o en la membrana del retículo endoplásmico y activan una cascada de señalización que terminan en la estimulación de la expresión de genes de respuesta a citocininas. Esta señalización es muy parecida al sistema de dos componentes presentes en bacterias (Hutchison & Kieber, 2002) (**Figura 2**).

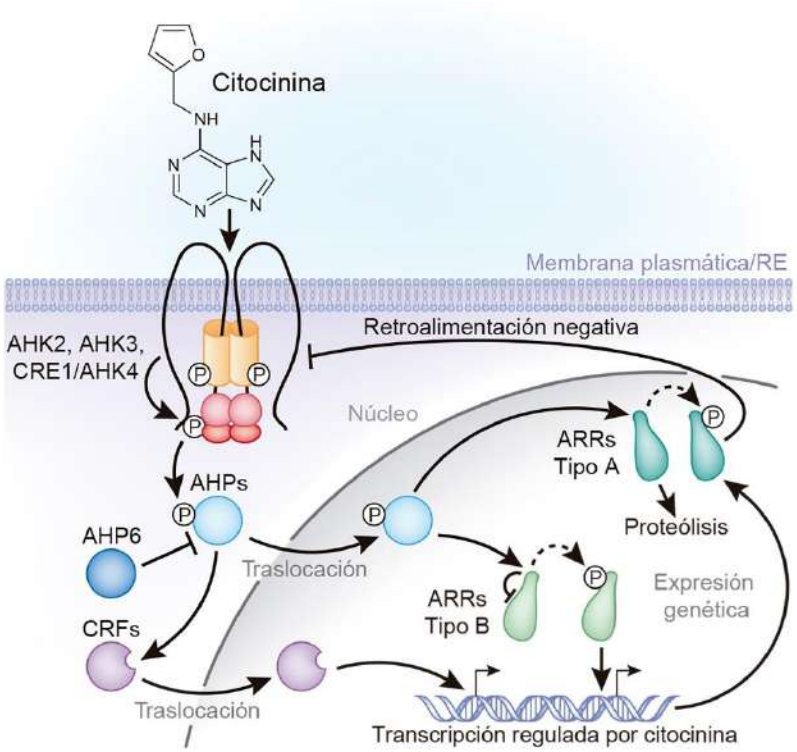


Figura 2. Percepción y ruta de señalización de las citocininas. La unión de la citocinina al receptor AHK**,** induce la autofosforilación de su residuo His éste receptor, posteriormente el grupo fosfato es trasferido al residuo Asp dentro del dominio receptor del mismo receptor AHK. Subsecuentemente el grupo fosfato es trasferido a la proteína AHP para activarla. Una vez activa, la proteína AHP se trasloca al núcleo donde interactúa con las ARRs para transferirle el grupo fosfato. Las ARRs tipo A, actúan como represores de la señalización de las citocininas, mientras que las ARRs tipo B actúan como reguladores trasncripcionales de genes inducibles a citocininas, incluyendo a los genes que codifican a las ARRs tipo A. los factores de transcripción CRF (factores de respuesta a citocininas) también son activadas por citocininas y se traslocan al núcleo para regular la transcripción de genes regulados por citocininas (Modificado de Santner et al., 2009).

Las citocininas se han implicado en diversos procesos de crecimiento y desarrollo vegetal. En la parte aérea, las citocininas promueven la división celular en el meristemo del brote para la formación de nuevas hojas (Hutchison & Kieber, 2002; Werner et al., 2003; Higuchi et al., 2004; Nishimura et al., 2004; Ferreira & Kieber, 2005; Riefler et al., 2006; Werner & Schmülling, 2009). En contraste, inhiben el crecimiento de la raíz y la formación de las raíces laterales por promover la diferenciación en el meristemo apical (Li et al., 2006; Dello Ioio et al., 2007, 2008; Laplaze et al., 2007). Mutaciones en los genes que participan en la biosíntesis, percepción y señalización de las citocininas demuestran el papel fundamental de esta fitohormona en el crecimiento vegetal (Hutchison & Kieber, 2002; Werner et al.,

2003; Nishimura et al., 2004; Higuchi et al., 2004; Ferreira & Kieber, 2005; Riefler et al., 2006; Werner & Schmülling, 2009; Kieber & Schaller, 2018).

5.3 Etileno

El etileno es una pequeña fitohormona con una estructura simple C_2H_4. Su naturaleza en forma de gas permite la comunicación entre plantas (Dubois et al., 2018). La ruta de biosíntesis del etileno comienza con la metionina que es convertido a ACC por la enzima ACC sintasa, siendo el ACC el precursor del etileno. La síntesis de esta fitohormona es regulada por señales internas durante el desarrollo y en respuesta a estímulos ambientales como estrés biótico y abiótico. Una vez sintetizado, el etileno es censado por sus receptores que se encuentran en la membrana del retículo endoplásmico y aparato de Golgi y desencadena una cascada de señalización iniciada por estos receptores (Wang et al., 2002; Ju & Chang, 2015; Yang et al., 2015; Dubois et al., 2018) (**Figura 3)**.

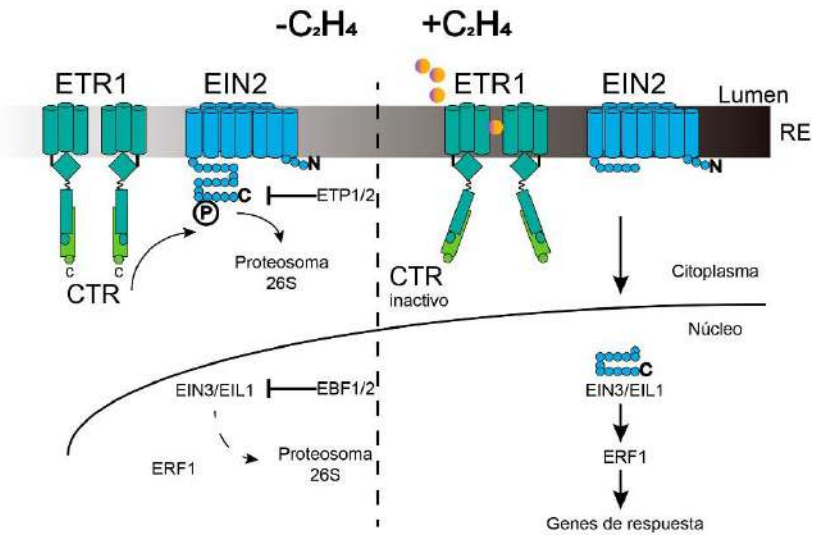


Figura 3. Percepción y ruta de señalización del etileno. El etileno es percibido por una familia de receptores (ERS1, ERS2, ETR1, ETR2 y EIN4). Estos receptores son activos en ausencia de etileno e interactúa con la región N-terminal de la proteína CTR1 para formar un complejo. A su vez, CTR1 fosforila el dominio terminal de la proteína EIN2 que se localiza en el retículo endoplásmico para reprimir la señalización. En presencia de etileno, el receptor y CTR1 son inactivados que resulta en la desfosforilación de EIN2 y ruptura, liberando un fragmento del C-terminal que se mueve hacia el núcleo. Estando en el núcleo participa en la estabilización y acumulación de EIN3/EIL1 y consecuentemente induce la transcripción de ERF1 y otros genes de respuesta a etileno (Modificado de Ju & Chang, 2015).

El etileno tiene varias funciones, regula el desarrollo de las hojas, la senescencia, la maduración de fruto, estimula la germinación y además está implicado en la respuesta a estrés de tipo biótico y abiótico (Dubois et al., 2018). Uno de los efectos mejor conocidos es la inhibición del crecimiento. Así, altas concentraciones de etileno reducen el crecimiento vegetal, mientras que las mutaciones en los componentes de la señalización, promueven el crecimiento (Pierik et al., 2007; Vandenbussche & Straeten, 2012; Ju & Chang, 2015; Dubois et al., 2018). Por lo tanto, las rizobacterias que expresan ACC-deaminasa que elimina el etileno, disminuye su concentración y promueve el crecimiento vegetal (Broekaert et al., 2006; Khatabi & Schäfer, 2012; Gamalero & Glick, 2015; Orozco-Mosqueda et al., 2020). Sin embargo, la mayoría de la regulación del crecimiento vegetal por etileno se da en conjunto con otras fitohormonas, principalmente las auxinas (Iqbal et al., 2017). Así, por ejemplo, la senescencia de las hojas, floración, maduración de frutos, el desarrollo de la raíz, como la elongación de la raíz, formación de raíces laterales y pelos radiculares son controlados por la acción del etileno junto con las auxinas (Masucci & Schiefelbein, 1994; Pitts et al., 1998; Ruzicka et al., 2007; Ivanchenko et al., 2008; Zhang et al., 2016; Iqbal et al., 2017).

5.4 Otras fitohormonas

Además de las auxinas, las citocininas, y el etileno, el crecimiento y el desarrollo vegetal también se regula por otras fitohormonas como las giberelinas, ácido abscísico, ácido jasmónico, ácido salicílico y brasinosteroides. Las auxinas, citocininas, etileno, giberelinas y brasinosteroides parecen controlar principalmente el crecimiento vegetativo. Mientras que el ácido abscísico, junto con el etileno participan en la maduración, dormancia y germinación de las semillas, maduración de frutos y respuesta a estrés abiótico. Por otro lado, el ácido jasmónico y el ácido salicílico participan principalmente en la respuesta de defensa ante el ataque de patógenos. Finalmente, la mayoría de las acciones de las fitohormonas sobre el crecimiento y desarrollo vegetal, junto con las respuestas de defensa dependen de las interacciones entre hormonas que ocurren en algún punto de su señalización (Williams, 2010).

6. Interacción fitohormonas-Target of Rapamycin (TOR)

El crecimiento y desarrollo vegetal es controlado por señales endógenas y ambientales. Las fitohormonas controlan diversos procesos en las plantas, y el efecto hormonal es influenciado por el estado nutricional vegetal. Estudios recientes indican que las auxinas, citocininas, brasinosteroides, ácido jasmónico, ácido abscísico y ácido salicílico y sus rutas de señalización, interactúan con la señalización implicada en la percepción del estado nutricional vegetal mediado por la proteína TOR (Bögre et al., 2013; Dong et al., 2015; Kravchenko et al., 2015; Deng et al., 2016; Pfeiffer et al., 2016; Xiong et al., 2016; Zhang et al., 2016; Li et al., 2017; Schepetilnikov et al., 2017; Schepetilnikov & Ryabova, 2017; Song et al., 2017; De Vleesschauwer et al., 2017; Wang et al., 2018; Salem & Giavalisco, 2019). Se ha reportado que las auxinas activan a la proteína ROP2 y esta a su vez fosforila y activa a la proteína TOR para controlar la traducción de RNAs mensajeros (Schepetilnikov et al., 2011, 2013, 2017). Además, a nivel fisiológico la señalización auxina/citocinina-ROP2-TOR controla la actividad meristemática tanto de la parte área como de la raíz (Pfeiffer et al., 2016; Li et al., 2017). Sin embargo, la activación del meristemo también depende estrictamente de la disponibilidad de nutrientes, en este caso de la glucosa proveniente de la fotosíntesis (Xiong et al., 2013; Li et al., 2017). Además, la señalización por TOR está implicada en la respuesta de defensa ante patógenos controlada por las fitohormonas ácido jasmónico y ácido salicílico (De Vleesschauwer et al., 2017). Finalmente, la señalización por TOR es regulada por el ácido abscísico en presencia de estrés abiótico (Wang et al., 2018). La interacción entre la señalización hormonal y la señalización nutricional es compleja, y recientemente se están comenzando a dilucidar los componentes implicados en esta interacción. A continuación, se describirá el funcionamiento de la proteína TOR.

7. TOR en mamíferos

La proteína Blanco de la Rapamicina (TOR; **T**arget **O**f **R**apamycin), fue inicialmente identificada en *Saccharomyces cerevisiae* por mutaciones en los genes TOR1-1 y

TOR2-1, que confiere resistencia a la rapamicina, un compuesto producido por la bacteria *Streptomyces hygroscopicus* con capacidad de inhibir el crecimiento y la proliferación celular. Posteriormente, fue identificada en células animales, y en estos organismos se conoce como mTOR (mammalian TOR) (Wullschleger et al., 2006). Se sabe que el genoma de cada organismo eucariota posee un solo gen TOR, a diferencia de algunas levaduras que poseen dos genes (Wullschleger et al., 2006; Saxton & Sabatini, 2017). Se considera a TOR como una proteína reguladora del crecimiento y metabolismo celular, en respuesta a diversos estímulos incluyendo nutrientes y factores de crecimiento (Saxton & Sabatini, 2017). La proteína TOR tiene un tamaño de 280 kDa aproximadamente, y pertenece a la familia de las cinasa relacionadas a la fosfatidilinositol 3 cinasa (phosphatidylinositol kinase-related kinase, PIKK). Los miembros de la familia PIKK contienen en su amino terminal un tándem de repetidos HEAT (Huntington, Elongation Factor 3 regulatory, subunit A of PP2A) y un dominio FAT (FRAP-ATM-TTRAP), posteriormente se encuentra el dominio de unión a rapamicina, FRB (FKBP- rapamycin-binding) (**Figura 4**). En el extremo carboxilo terminal se encuentra el dominio cinasa serina/treonina similar al dominio catalítico de las fosfatidilinositol-3-cinasa, en este mismo extremo se encuentra el dominio FACT (Wullschleger et al., 2006; Yang et al., 2013; Saxton & Sabatini, 2017). La proteína mTOR interactúa con diferentes proteínas para formar dos complejos distintos: complejo 1 mTOR (mTORC1) y complejo 2 mTOR (mTORC2), para llevar a cabo su función (Laplante & Sabatini, 2012b; Kim & Guan, 2019). Similar al de levaduras, el complejo mTORC1 está compuesto por tres componentes principales: mTOR, RAPTOR (Regulatory Protein Associated with mTOR) y mLST8 (mammalian Lethal with Sec13 protein 8, también conocida como GßL). La función de RAPTOR es facilitar el reclutamiento del sustrato de mTORC1 y también se requiere para la correcta localización de este complejo. mLST8 se asocia con el dominio catalítico de mTORC1 y estabiliza la activación cinasa. Además de estos componentes, mTORC1 también tiene dos subunidades inhibitorias, conocidas como PRAS40 (proline-rich Akt sub- strate of 40 kDa) y DEPTOR (DEP domain containing mTOR interacting protein). Por su parte, el complejo mTORC2 también contiene mTOR y mLST8. Pero en lugar de

RAPTOR, contiene RICTOR (Rapamycin Insensitive Companion of mTOR). También, contiene DEPTOR y la subunidad regulatoria mSin1 y PROTOR 1/2. Estos dos complejos también pueden ser diferenciados por su sensibilidad a rapamicina, donde mTORC1 es sensible a rapamicina porque permite la unión del complejo rapamicina-FKBP12 a su dominio FRB y el mTORC2 es insensible a rapamicina. No obstante, tratamientos prolongados de rapamicina bloquean la señalización mTORC2, posiblemente por la incapacidad de mTOR unido a rapamicina para incorporarse a nuevos complejos mTORC2 (Loewith et al., 2002; Laplante & Sabatini, 2012b; Blenis, 2017; Saxton & Sabatini, 2017).

7.1 Ruta de señalización de TOR en mamíferos

El complejo mTORC1 percibe diferentes señales como factores de crecimiento (por ejemplo, insulina), estrés genotóxico, niveles de energía (radio de ATP/AMP), oxígeno y nutrientes (aminoácidos), para regular muchos procesos de crecimiento involucrados en la promoción del crecimiento y proliferación celular (Laplante & Sabatini, 2012a; Shimobayashi & Hall, 2014). La mayoría de estas señales regulan la actividad de mTORC1 involucrando al complejo de esclerosis tuberosa (TSC), que funciona como un regulador negativo de mTORC1 (**Figura 4**). El complejo heterotrimerico TSC está compuesto de TSC1 y TSC2. TSC2 es el que regula negativamente a mTORC1 porque mantiene a la GTPasa Rheb en su estado inactivo de unión a GDP. Los factores de crecimiento como la insulina, estimulan a mTORC1 a través de la vía PI3K-PDK1-AKT. En esta vía, AKT fosforila a TSC2 en múltiples sitios e inhibe la actividad del complejo TSC y desencadena la disociación de TSC del lisosoma, lo que permite que RHEB cargado con GTP se una al dominio catalítico de mTORC1 y la active. Las señales de nutrientes son trasmitidas a mTORC1 a través de la acción de las GTPasas Rag. Esta proteína se une a TORC1 promoviendo su translocación del citoplasma hacia la membrana del lisosoma donde se cree que se encuentra Rheb. Por otro lado, los bajos niveles de energía y estrés son censados por mTORC1 involucrando a la proteína cinasa activada por AMP (AMPK). En esta situación, AMPK fosforila a TSC2 y RAPTOR que lleva a la inhibición de TORC1 SGK1 (Laplante & Sabatini, 2009; Laplante & Sabatini, 2012a,

2012b; Shimobayashi & Hall, 2014; Blenis, 2017; Saxton & Sabatini, 2017; Kim & Guan, 2019).

Una vez activado, el complejo mTORC1 promueve la síntesis de proteínas mediante la fosforilación de la cinasa ribosomal S6 (S6K) y la proteína 1 de unión a eIF4E (4E-BP1). Además, induce la biosíntesis de lípidos activando a los factores de transcripción PPAR y SREBP1. De manera contraria, mTORC1 inhibe la autofagia a través de la fosforilación del complejo ULK1-Atg13-FIP200 (Saxton & Sabatini, 2017).

A diferencia de mTORC1, la regulación de mTORC2 es poco conocida hasta ahora. Se sabe que es estimulado principalmente por factores de crecimiento a través de la vía PI3K y una vez activo controla la supervivencia celular, metabolismo y organización del citoesqueleto mediante la fosforilación de un conjunto de proteínas cinasas de la familia AGC o PKC incluyendo a AKT y SGK1 (Laplante & Sabatini, 2009; Laplante & Sabatini, 2012a, 2012b; Shimobayashi & Hall, 2014; Blenis, 2017; Saxton & Sabatini, 2017; Kim & Guan, 2019).

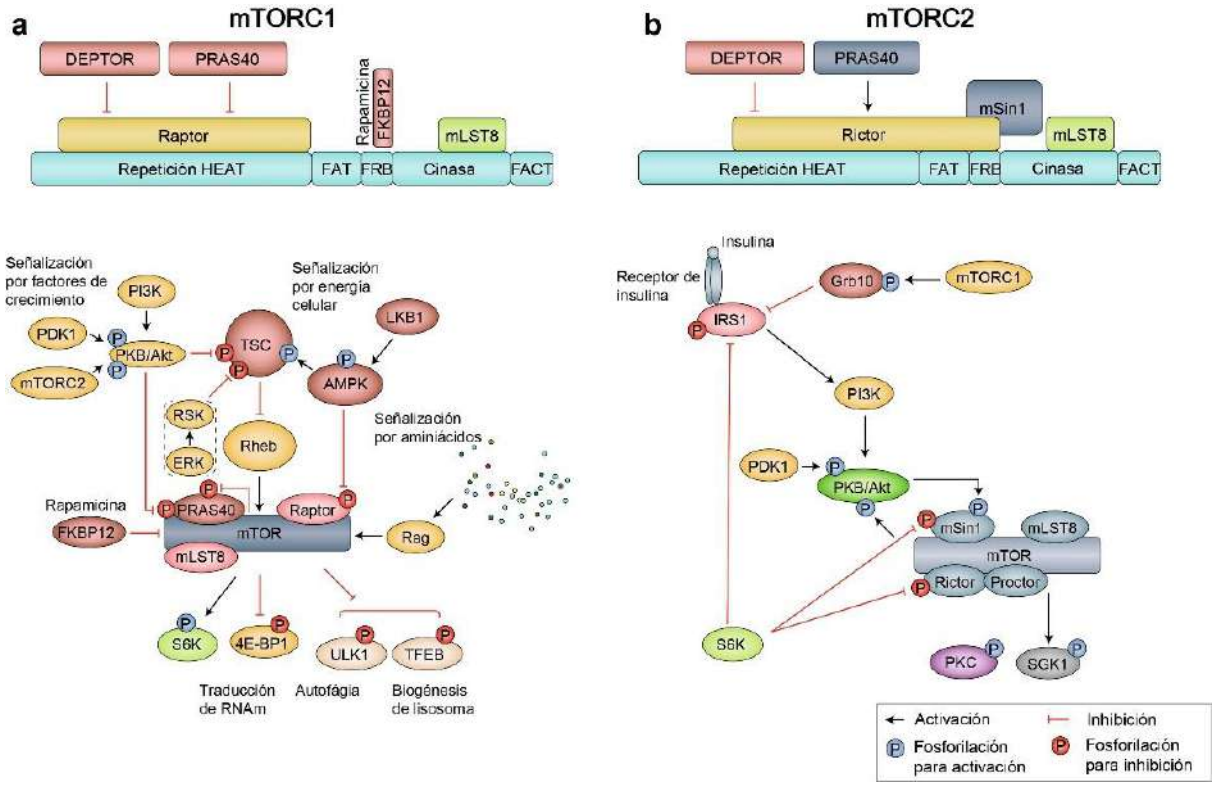


Figura 4. Complejos de la proteína TOR y su ruta de señalización en mamíferos. mTOR contiene dominios de unión a proteínas como repetición HEAT, FAT, FRB, cinasa y FACT, que regulan su función **a**. Complejo TORC1. Este complejo es sensible a la rapamicina ya que el complejo rapamicina-FKBP12 se une al dominio FRB. TORC1 es activado por factores de crecimiento (insulina), energía, y aminoácidos. La señalización de TORC1 es inactivada por AMPK en condiciones de estrés. TORC1 controla procesos como traducción, autofagia y biogénesis de lisosomas involucrando la señalización de PI3K, TSC y Rag. **b**. Complejo TORC2. A diferencia de TORC1, TORC2 es insensible a rapamicina y, además, en vez del componente ROPTOR posee RICTOR. La señalización de TORC2 es activada por factores de crecimiento a través de la vía PI3K para controlar supervivencia celular, metabolismo y la organización del citoesqueleto (Modificado de Kim & Guan, 2019).

7.2 TOR en enfermedades humanas

Como se ha mencionado con anterioridad, la señalización por TOR juega un rol muy importante en muchas funciones celulares como el crecimiento y proliferación celular. Su desregulación conduce a la generación de enfermedades humanas como el cáncer, obesidad, diabetes tipo dos, envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas (Laplante & Sabatini, 2012b). La participación de TORC1 y TORC2 en cáncer se debe a que se encuentra rio debajo de la señalización que frecuentemente está desregulada en la mayoría de los canceres. Dentro de estas rutas de señalización encontramos a la vía PI3K/Akt, así como la de

Ras/Raf/Mek/Erk, que resulta en la hiperactivación de TORC1. Las mutaciones en los componentes de esta ruta de señalización han sido relacionadas con cáncer. Por ejemplo, la mutación en el complejo TSC1/2 desencadena la formación de linfangioleiomiomatosis, y esclerosis tuberosa. Varios componentes de la ruta señalización que participan en la percepción de nutrientes y que activan a TORC1 se han implicado en la progresión del cáncer, esto incluye al complejo GATOR1 que participa en la formación de glioblastoma. La mutación en la proteína RagC (una subfamilia de las GTPasas relacionada a Ras, proteínas que se unen al nucleótido guanosina) se relaciona con el linfoma folicular. Además, se han encontrado mutaciones en el gen que codifica a la foliculina (FLCN) en el síndrome del cáncer hereditario Birt-Hogg Dubé. Finalmente, se han encontrado mutaciones en la proteína TOR en algunos subtipos de cáncer (Laplante & Sabatini, 2012b; Saxton & Sabatini, 2017).

Por otro lado, hay evidencias de que el complejo TORC2 también participa en la generación del cáncer. Muchos gliomas sobrexpresan a RICTOR que es la subunidad de TORC2 y su alta expresión aumenta el ensamble de TORC2 que conlleva a un incremento en la proliferación celular y potencial de invasión del cáncer de próstata en ratas. Además, se ha reportado que la perdida de la función de PTEN también deriva en la formación del cáncer de próstata en humanos (Saxton & Sabatini, 2017).

Actualmente se usan algunos inhibidores de la actividad de TOR, conocidos como rapalogos, para tratar enfermedades como el cáncer. El primer inhibidor de TOR empleado fue Temsirolimos de la farmacéutica Pfizer, probado en el tratamiento de carcinoma renal celular avanzado. A esto le siguió Everolimos de Novartis en el año 2009. Sin embargo, los beneficios clínicos de los rapalogos son limitados debido a la resistencia que presentan algunos tipos de cáncer. Para vencer este obstáculo, se han generado inhibidores de primera y segunda generación que compiten con el sitio de unión a ATP del domino cinasa de TOR. Estos inhibidores son conocidos como inhibidores ATP competitivos, e incluyen a Torin 1, 2, PP242, AZD-8055, entre otros. Estos compuestos inhiben la actividad de los TORC1 y TORC2, previniendo

la fosforilación de sus blancos (Laplante & Sabatini, 2012b; Blenis, 2017; Sabatini, 2017; Saxton & Sabatini, 2017; Kim & Guan, 2019).

Además del cáncer, diversos estudios en ratones han revelado la participación de TOR en procesos asociados a enfermedades como homeostasis de la glucosa, formación de la masa muscular, adipogénesis y homeostasis de lípidos, en el funcionamiento del sistema inmune y funcionamiento del cerebro. En todos estos procesos, la desregulación de TOR conduce a la generación de enfermedades como la diabetes tipo dos, atrofia muscular, obesidad por la alta formación de adipocitos y síntesis de lípidos, mal funcionamiento del sistema inmune ya que participa en la maduración de las células T, epilepsia, autismo, tumores cerebrales y, por último, en procesos de envejecimiento. En este último, se ha observado que la inhibición de TOR por rapamicina, prolonga el tiempo de vida de diversos organismos como las levaduras, gusanos, moscas y animales (Saxton & Sabatini, 2017). Aunque se conoce la implicación de TOR en diversas enfermedades, el mecanismo molecular por el cual las regula es mayormente desconocido. Conocer estos mecanismos ayudaría a entender el proceso de formación de las enfermedades, y así, buscar tratamientos adecuados.

8. TOR en plantas

La proteína TOR se encuentra conservada en todos los eucariontes debido a su función fundamental en la regulación del crecimiento y proliferación celular (**Figura 5a**). En *Arabidopsis*, se ha encontrado un gen (AtTOR) localizado en el cromosoma 1 que codifica a la proteína TOR con una masa molecular de aproximadamente 270 kDa (Menand et al., 2002). El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de AtTOR con otras secuencias de TOR, muestran que el dominio cinasa y el dominio FRB son las más conservadas, pareciéndose más a la proteína TOR de animales (Menand et al., 2002). No obstante, los primeros estudios indicaron que la proteína TOR de *Arabidopsis thaliana* era insensible a rapamicina, debido a que el dominio FRB de AtTOR no interactuaba con el complejo rapamicina-FKBP12, haciendo difícil

el estudio de TOR en plantas en ese momento (Menand et al., 2002; Mahfouz, 2006). Posteriormente, se demostró que la rapamicina estimulaba la interacción entre la proteína FKBP12 tanto de *Arabidopsis* como de humanos con el dominio FRB de AtTOR (Xiong & Sheen, 2012). Asimismo, la sobreexpresión de FKBP12 de animales, levaduras y de *Arabidopsis* incrementa la sensibilidad a más de 100 veces a rapamicina en cultivo de células vegetales y plantas transgénicas (Ren et al., 2012; Xiong & Sheen, 2012; Deng et al., 2016, 2017), facilitando así, el estudio de TOR en organismos vegetales.

Además, el genoma de los organismos fotosintéticos como las plantas y algas codifica genes ortólogos de los miembros del complejo TORC1, incluyendo a RAPTOR1/2 y LST8-1/2, cada uno codificado por dos genes (Van Dam et al., 2011; Roustan et al., 2016). En contraste, no hay evidencia del complejo TORC2 en plantas, debido a que los componentes de este complejo como RICTOR no se han encontrado en organismos fotosintéticos. No obstante, muchos procesos regulados por TORC2 en animales, también existen en plantas, lo que sugiere que las plantas pueden emplear complejos TOR de manera independiente de RAPTOR (Van Dam et al., 2011).

Además, algunos de los componentes que se encuentran rio abajo de la señalización TOR, como la proteína S6K1 y S6K2, la subunidad pequeña del ribosoma (RPS6A/B), ATG y la proteína de 46 kD asociada a fosfatasas tipo 2A (TAP46) también son conservadas en plantas y animales, e indica que la señalización TOR está parcialmente conservada en estos dos grupos de organismos (Van Dam et al., 2011; Rexin et al., 2015).

8.1 Función de TOR en el crecimiento y desarrollo vegetal

A pesar de las diferencias de TOR entre plantas y animales, su función de coordinar el crecimiento y desarrollo se encuentra conservada (Xiong & Sheen, 2014). El primer estudio de la función de TOR en *Arabidopsis* mediante el uso de la línea transgénica *TOR:GUS* (*TOR/tor1*), demostró que la expresión de esta proteína es alta en embriones, endospermo, meristemo de la raíz, meristemo de la parte aérea,

botones florales y en los primordios de las raíces laterales (Menand et al., 2002). Además, la mutación de este gen bloquea el desarrollo embrionario en la etapa de 16-32 células, indicando su participación en el desarrollo embrionario y crecimiento vegetativo (Menand et al., 2002; Ren et al., 2011). Subsecuentes estudios empleando inhibidores de TOR o utilizando RNA de interferencia, indicaron que está implicado en el desarrollo post-embrionario como la expansión de cotiledones, formación de hojas verdaderas, crecimiento de la raíz primaria y raíces laterales, formación de pelos radiculares, producción de semillas, floración y senescencia. Todos estos procesos son controlados mediante la modulación de la traducción, transcripción, autofagia y metabolismos primario y secundario (Deprost et al., 2007; Ren et al., 2011, 2012; Xiong & Sheen, 2012; Caldana et al., 2013; Xiong et al., 2013). Por lo tanto, el crecimiento vegetal se correlaciona positivamente con la expresión o actividad de TOR. Así, una disminución tanto de su actividad como de su expresión conlleva a una reducción en la formación y expansión de las hojas, crecimiento de la raíz, y reducción en la elongación de los pelos radiculares. Una moderada expresión de TOR incrementa el crecimiento de la raíz, hojas, producción de semillas, mientras que una alta expresión resulta en severas afectaciones como defectos en el desarrollo de las hojas, en la floración, hipocotilo corto, arquitectura compacta con peciolos cortos, senescencia temprana, raíces tuberosas, y perdida de dominancia apical. Todos estos resultados sugieren que la regulación precisa espacio-temporal de la expresión y actividad de TOR es crucial para el crecimiento y desarrollo vegetal (Ren et al., 2011, 2012; Xiong & Sheen, 2014). Además, la mutación en los componentes del complejo o señalización TORC1 como RAPTOR1/2, LST8-1/2, S6K1/2, RPS6A/B resultan en afectaciones en el crecimiento vegetativo, reducción en la dominancia apical y desarrollo de flores anormales, reforzando el papel de TOR en estos procesos (Anderson et al., 2005; Deprost et al., 2007; Moreau et al., 2012; Ren et al., 2012).

8.2 Ruta de señalización de TOR en plantas

8.2.1 Componentes arriba de la ruta de TOR

En contraste a los progresos para conocer la señalización por TOR en animales, en plantas los componentes que se encuentran arriba y abajo de esta señalización son poco conocidos (**Figura 5b**). A pesar de que los procesos controlados por TOR en animales y plantas son conservados, la forma de regulación puede ser muy diferente. Esto se debe a que algunos componentes que se encuentran arriba de TOR en animales no se encuentran en plantas, como por ejemplo, los principales reguladores tales como el Complejo de Esclerosis Tuberosa 1/2 (TSC1/2), la proteína de unión a GTP conocida como Homologo de Ras enriquecido en cerebro (Rheb), Guanosina 5´-Trifosfatasas (RAGs), PI3Ks clase I-II, y la fosfocinasa B (Serfontein et al., 2010; Van Dam et al., 2011). Esta ruta, la que involucra al complejo TORC1, es activada por nutrientes y factores de crecimiento, pero inactivada por la disminución de energía y estrés en plantas y animales (Saxton & Sabatini, 2017; Shi et al., 2018). En plantas, se ha reportado que la glucosa y la sacarosa derivadas de la fotosíntesis, estimulada por la luz y CO_2, activan a la proteína TOR (Xiong & Sheen, 2012; Xiong et al., 2013). Esta activación es mediada por el metabolismo de la glucosa a través de la glucólisis y la cadena trasportadora de electrones (CTE), ya que los inhibidores de la glucólisis y de la CTE la inhiben (Xiong et al., 2013; Xiong & Sheen, 2013). Similar a la inactivación de AMPK en animales que representa un mecanismo conservado de respuesta a estrés y energía, la activación de TOR por glucosa en plantas también es mediada por la inactivación de la proteína cinasa conservada SnRK, censora de energía y glucosa (SnRK1: cinasa 1 relacionada a SNF1, el ortólogo de la subunidad α de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK)) (Shi et al., 2018). *Arabidopsis* posee los genes *KIN10* y *KIN11* que codifican una subunidad catalítica del complejo heterotrimerico SNRK1 que es activado e inactivado por estrés y glucosa respectivamente (Baena-González et al., 2007). Además, se ha mostrado mediante ensayos *in vivo* empleando hojas de tabaco trasformadas con KIN10 y RAPTOR1B etiquetadas con mCherry y GFP respectivamente, que la proteína KIN10 interactúa y fosforila a la proteína RAPTOR

para regular el crecimiento en respuesta a los niveles de energía (Nukarinen et al., 2016).

Además de la glucosa, los aminoácidos también activan a la proteína TOR mediante mecanismos desconocidos (Xiong & Sheen, 2015). En animales la percepción de TOR es mediada por las GTPasas RAG heterotriméricas que reclutan a TORC1 en la membrana del lisosoma y junto con la proteína RHEB activan a la proteína TOR (Saxton & Sabatini, 2017). Sin embargo, las plantas no poseen ortólogos de GTPasas ni RHEB indicando que los aminoácidos son percibidos de diferente manera. Asimismo, también se sugiere que las plantas censan el nitrógeno, azufre y fosforo involucrando a la ruta de señalización TOR (Deprost et al., 2007; Dong et al., 2017; Shi et al., 2018).

Se ha demostrado que la activación de los meristemos tanto del follaje y de la raíz es controlada por la ruta de señalización de TOR en respuesta a la luz y las fitohormonas. La percepción de luz por los fitocromos presentes en el follaje estimulan la expresión de genes que participan en la biosíntesis de las auxinas y el gen que codifica para la proteína ROP2 (una pequeña GTPasa ROP/RAC) (Li et al., 2017). Mediante un mecanismo desconocido, las auxinas activan a la proteína ROP2 y esta a su vez interactúa y activa a la proteína TOR vía fosforilación. Este proceso es muy similar a la activación del complejo TORC1 por RHEB en animales y humanos (Schepetilnikov et al., 2017). De manera interesante, se ha encontrado que existe un sinergismo entre luz, glucosa y las auxinas en la activación de la proteína TOR durante el desarrollo de los primordios de las hojas, ya que las auxinas no pueden activarla en ausencia de glucosa. Por otro lado, la biosíntesis de las auxinas estimuladas por la luz, no son requeridas para activar a TOR en el meristemo de la raíz, probablemente porque las auxinas sintetizadas en el follaje son transportadas hacia la raíz para participar en la activación del meristemo (Schepetilnikov et al., 2013, 2017; Xiong et al., 2013; Li et al., 2017). En contraste a las auxinas, la hormona ácido abscísico (ABA) reprime la activación de TOR, esto se debe a que en presencia de estrés, ABA activa a la proteína SnRK2 y fosforila a

RAPTOR1 haciendo que se disocie del complejo AtTORC1 e impidiendo que TOR reclute sus sustratos para su fosforilación (Wang et al., 2018).

Se ha demostrado también que el factor de reiniciación viral transactivador-viroplasmina (TAV) estimula la señalización TOR-S6K1. Cuando TOR es estimulado se una a los poliribosomas y regula la reiniciación de la traducción de RNAs mensajeros (Schepetilnikov et al., 2011).

8.2.2 Componentes debajo de la ruta de TOR

En animales, los blancos mejor caracterizados del complejo TORC1 son 4E-BP1 (proteína de unión a eIF4E) y S6K1, que participan en la traducción (Saxton & Sabatini, 2017). La proteína TOR en plantas, también regula la transcripción de RNAr, activación de genes ribosomales, ensamble de ribosomas y el control traduccional (Schepetilnikov & Ryabova, 2018; Shi et al., 2018). A pesar de la función fundamental que desempeña la proteína 4E-BP1 en la regulación de la traducción en eucariotas, en plantas, no se han encontrado ortólogos de esta proteína. Por lo tanto, algunos reportes sugieren que TOR controla la traducción empleando otras proteínas (Schepetilnikov & Ryabova, 2018; Shi et al., 2018).

Por otro lado, *Arabidopsis* posee dos genes homólogos de la proteína cinasa ribosomal S6 (S6K) de animales, conocidos como AtS6K1 y AtS6K2. Inicialmente se encontró que S6K1 interactúa directamente con la proteína RAPTOR, un componente del Complejo AtTORC1 (Mahfouz, 2006). Posteriormente se reportó que la región de fosforilación (FLGFTYVAP) de TOR en S6K1 en humanos esta conservada en los ortólogos S6K1 y S6K2 de *Arabidopsis*. Empleando un anticuerpo especifico contra el péptido Thr(P)-389 de S6K1 en humanos fosforilado por mTOR, se encontró que TOR fosforila tanto a S6K1 y S6K2 de *Arabidopsis* en la Thr-449 y Thr-455, respectivamente, estableciéndose como un marcador molecular y bioquímico de la actividad de TOR (Xiong & Sheen, 2012; Xiong et al., 2013). Una vez activa, S6K1 fosforila a la proteína ribosomal S6 (RPS6) e induce la fosforilación del factor 3 de iniciación eucariótica (eIF3h), para controlar la reiniciación de la traducción de RNAs mensajeros (Mahfouz, 2006; Schepetilnikov et al., 2013).

Además, TAP46, un ortólogo de TAP42 en levaduras que funciona como una subunidad regulatoria de la proteína fosfatasa 2A, también regula la traducción. El silenciamiento de TAP46, causa una represión en la traducción, disminuye la incorporación de metionina y activa la autofagia. Un análisis posterior sugiere que TAP46 interactúa con S6K1 y S6K2 en el citosol y posiblemente de esta manera contralan la traducción (Ahn et al., 2011, 2015).

En plantas, la proteína TOR se expresa más en zonas donde hay mayor actividad celular como en los meristemos del follaje y de la raíz, sugiriendo su participación en la división celular (Menand et al., 2002). Enfoques químicos y genéticos, revelan que la glucosa derivada de la fotosíntesis activa la división celular en el meristemo de la raíz y del follaje de manera dependiente de TOR. Durante este proceso, la glucosa y las auxinas activan a la proteína, que a su vez fosforila al factor de transcripción E2Fa y E2Fb para controlar la transcripción de genes de la fase S del ciclo celular en los meristemos (Xiong et al., 2013; Li et al., 2017). Adicionalmente, se ha reportado que la proteína S6K puede ser activadora o represora de la división celular dependiendo del compartimento y condición celular en que se encuentre (Shi et al., 2018). S6K1 se asocia con el complejo (relacionado al retinoblastoma 1) RBR1-E2FB y esta asociación permite la localización nuclear correcta de RBR1, así como la expresión dependiente de E2F de genes del ciclo celular. Así, en condiciones de estrés S6K reprime la proliferación celular requerida para la estabilidad del cromosoma y niveles de ploidia (Henriques et al., 2010).

Además de la traducción y la división celular, TOR también controla el metabolismo vegetal. Mediante análisis transcriptómicos y metabolómicos, se ha revelado que controla diversas vías implicadas en el metabolismo de la pared celular, metabolismo de fitohormonas, síntesis y almacenaje tanto de lípidos y almidón y síntesis de metabolitos secundarios, a pesar de ello, hasta ahora se conoce poco sobre el mecanismo molecular (Ren et al., 2012; Caldana et al., 2013; Xiong et al., 2013).

Esta proteína también es considerada como un regulador negativo de la autofagia en células animales, levaduras y plantas. La autofagia es un proceso natural o

estimulado por estrés, donde las células encierran los componentes citoplasmáticos en una estructura de doble membrana llamada autofagosoma y las envía a las vacuolas o a los lisosomas para su degradación y reciclaje (Xiong & Sheen, 2014; Michaeli et al., 2016; Soto-burgos & Bassham, 2017). En levaduras el complejo cinasa relacionado a autofagia 1 (ATG1)/ATG13/ATG17, juega un papel importante durante la autofagia y es un sustrato de TOR. El complejo cinasa ATG 1/13 también se ha caracterizado en *Arabidopsis* y se ha demostrado su papel en la regulación de la autofagia (Marshall & Vierstra, 2018). El complejo SnRK1 que censa el estrés, actúa arriba la ruta de TOR en la activación de la autofagia (Soto-burgos & Bassham, 2017).

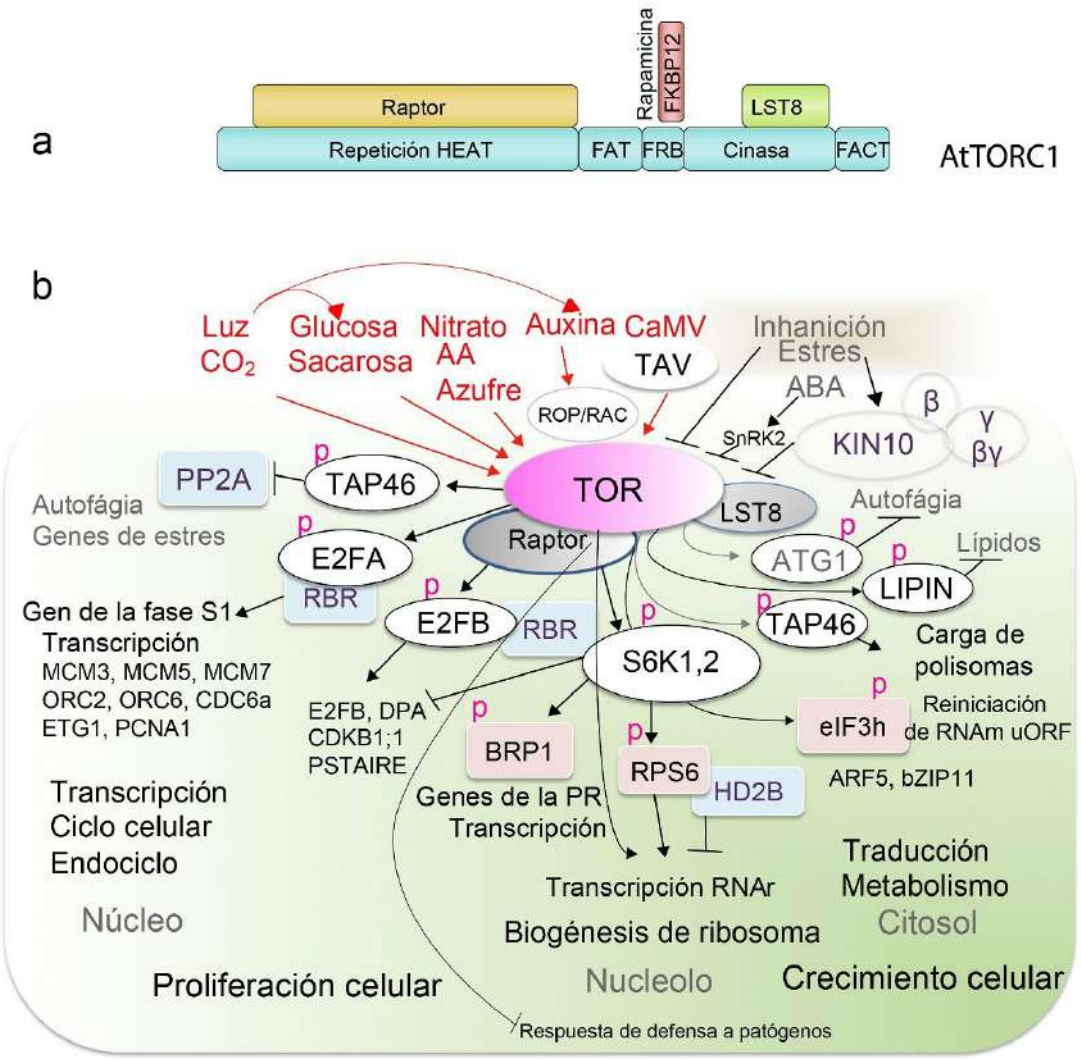


Figura 5. Ruta de señalización de TOR en plantas. **a**. Complejo TOR de plantas está compuesto principalmente de la proteína TOR, Raptor y LST8. Los dominios de AtTOR son similares a los de mTOR y es sensible a altas concentraciones de rapamicina. **b**. La señalización TOR en plantas es activada por luz, CO2, glucosa, sacarosa, nitratos, aminoácidos, azufre, auxinas, virus y es inactivada por estrés mediante ABA y SnRK2. La auxina activa a ROP2 que fosforila y activa a TOR para controlar la traducción y división celular en los meristemos. TOR fosforila diversas proteínas como TAP46, E2Fa/b, S6K1/2 y ATG1 para regular la proliferación y crecimiento celular y la autofagia. S6K: proteína cinasa ribosomal pequeña 6; TAP46: subunidad regulatoria de PP2A; E2Fa/b: factores de transcripción; RBR: represor de retinoblastoma; HD2B: histona desatilasa 2B; eIF3h: factor de iniciación de la traducción eucariótica 3h; ATG1: cinasa 1 relacionado a autofagia (Modificado de Xiong & Sheen, 2015).

8.3 TOR en interacción planta-microorganismo

Las plantas responden de manera constante a diferentes factores bióticos y abióticos que influencian su crecimiento e involucran a la ruta de señales regulada por TOR. La participación de esta ruta durante la interacción planta-microorganismo

es poco conocida hasta ahora. Sin embargo, existen algunos estudios que indican que es indispensable para el crecimiento y virulencia de hongos y bacterias patógenas (López-Berges et al., 2010; Yu et al., 2014; Harata et al., 2016; Nanjareddy et al., 2016; Popa et al., 2016; Marroquin-Guzman et al., 2017; De Vleesschauwer et al., 2017). Por ejemplo, los mecanismos de virulencia como la adhesión al hospedante, penetración y crecimiento invasivo de *Fusarium Oxysporum*, *Fusarium graminearum* y *Magnaporthe oryzae* fueron reprimidos por la presencia de amonio como fuente de nitrógeno, y esta represión fue restaurada con el tratamiento de rapamicina. En base a este resultado, los autores proponen la existencia de una ruta de respuesta al nitrógeno, conservada, que opera vía TOR para regular la virulencia en hongos fitopatógenos (López-Berges et al., 2010). Yu et al., (2014) reportó la presencia de componentes putativos de la señalización TOR, como las fosfatasas tipo 2A (FgPp2A), FgSit4 y FgPpg1 que interactúan con FgTap42 en *Fusarium graminearum*. Estos componentes juegan un papel positivo en varios procesos celulares como la integridad de la pared celular, metabolismo secundario, crecimiento del micelio y virulencia del hongo (Yu et al., 2014). Resultados similares se obtuvieron por Harata et al., (2016) y Marroquin-guzman et al., (2017), donde las proteínas *WHI2* y *ABL1* de *Colletotrichum orbiculare* y *Magnaporthe oryzae* respectivamente, actúan como reguladores negativos de la señalización TOR. La mutación de los genes *WHI2* y *ABL1* resulta en un crecimiento anormal de los hongos, indicando que la regulación de la señalización TOR por estos genes controlan la etapa biotrófica de *C. orbiculare*, la formación de la pared celular, desarrollo de apresorios y ultimadamente la virulencia de ambos hongos.

Por otro lado, las bacterias fitopatógenas involucran a la actividad de TOR durante la patogénesis. Así, la proteína AWR5, considerada como un efector tipo III producida por la bacteria fitopatógena *Ralstonia solanacearum*, inhibe la actividad de TOR. La expresión heteróloga de AWR5 en levaduras resulta en una inhibición del crecimiento e inducción de la autofagia de manera similar al tratamiento con rapamicina y ausencia de nitrógeno. Además, las plantas de *Arabidopsis thaliana* que poseen un RNA de interferencia hacia TOR (*TOR RNAi*), fueron más susceptibles a la infección de *R. solanacearum*, en comparación con las plantas

silvestres, indicando que la proteína AWR5 la inhibe para favorecer la infección (Popa et al., 2016). No obstante, la forma en que AWR5 inhibe la señalización TOR para beneficiar la infección, es aún desconocida.

En contraste al trabajo anterior, De Vleesschauwer et al., (2017) reportan que la inhibición de la función de TOR en plantas de arroz *OsRaptor1 RNAi*, resulta en un incremento en la resistencia a la bacteria *Xanthomonas oryzae pv. oryzae (Xoo)* cepa PXO99 y a los hongos fitopatógenos *Cochliobolus miyabeanus* y *Rhizoctonia solani Rhizoctonia*. Resultados similares fueron obtenidos cuando las plantas fueron tratadas con rapamicina y Torin2, observándose un aumento en la resistencia y consecuentemente una reducción en el número de bacterias que colonizan a la planta. Mientras que la sobreexpresión de TOR o de RAPTOR en plantas *TOR OX* y *Raptor OX* respectivamente, muestra un incremento en la susceptibilidad a la bacteria y a los hongos fitopatógenos. Este incremento o disminución de la resistencia a los patógenos en plantas de arroz se debe a que TOR antagoniza la acción de respuestas de defensa reguladas por las hormonas ácido salicílico y ácido jasmónico y se sugiere que actúa como un interruptor que regula el crecimiento vegetal a expensas de la inmunidad celular (De Vleesschauwer et al., 2017).

La contribución de TOR también se ha reportado en asociaciones benéficas, como es el caso de la interacción simbiótica entre plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y *Rhizobium tropici* (Nanjareddy et al., 2016). El análisis de la expresión del promotor de TOR fusionado con la proteína GFP en raíces de plantas de frijol, muestra que se expresa en los hilos de infección y en las células infectadas de nódulos maduros. El silenciamiento postranscripcional del gen, usando un RNA de interferencia, afecta el desarrollo de los hilos de infección y la división de las células corticales, que resulta en una disminución en el número de nódulos. Además, el silenciamiento de TOR también reduce la acumulación de especies reactivas de oxígeno, y altera la expresión de *CyclinD1* y *CyclinD3*, que son importantes para la formación de los hilos de infección y organogénesis del nódulo. En este estudio los autores sugieren que TOR es un elemento importante en el establecimiento de la interacción y en el

desarrollo del nódulo durante la simbiosis *Phaseolus vulgaris-Rhizobium tropici* (Nanjareddy et al., 2016).

Los estudios citados anteriormente demuestran que la ruta de señalización modulada por la proteína TOR está emergiendo como un componente importante en la interacción planta-microorganismo. Además, tomando en cuenta que los microorganismos, ya sean patógenos o benéficos, emplean diferentes estrategias para colonizar y desarrollar la patogénesis o promover el crecimiento vegetal, resulta interesante conocer el papel que juega esta ruta en estos diferentes tipos de interacción. Finalmente, su estudio nos ayudaría a entender mejor el mecanismo molecular que controla las respuestas de las plantas durante sus interacciones con los microorganismos.

9. JUSTIFICACIÓN

Los mecanismos moleculares activados por las rizobacterias benéficas en las plantas, para modificar la estructura de la raíz, son mayormente desconocidos. La proteína TOR es un regulador central del desarrollo y crecimiento tanto de células animales como de células vegetales. Debido a su importancia, es de gran relevancia explorar el papel que podría jugar en las plantas durante su interacción con rizobacterias benéficas, para promover el crecimiento vegetal.

10. HIPÓTESIS

Los cambios morfológicos de la raíz de *Arabidopsis thaliana* estimulados por *Azospirillum brasilense* Sp245 son regulados por la proteína TOR.

11. OBJETIVOS

11.1 Objetivo general

Analizar el papel de la proteína TOR durante la interacción *Azospirillum brasilense* Sp245-*Arabidopsis thaliana.*

11.1.1 Objetivos particulares

- Determinar el efecto de *A. brasilense* sobre la morfología de la raíz de *A. thaliana*.
- Examinar la distribución de la expresión de TOR en la planta durante la interacción con *A. brasilense.*
- Determinar la fosforilación de la proteína S6K durante la interacción.
- Analizar el efecto de la inhibición de la actividad de la proteína TOR sobre la fosforilación de la proteína S6K y sobre el crecimiento vegetal durante la interacción.

12. RESULTADOS

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo se presentan en los siguientes capítulos:

Capítulo 1. TARGET OF RAPAMYCIN signaling plays a role in *Arabidopsis* growth promotion by *Azospirillum brasilense* Sp245. Publicado en la revista Plant Science.

Capítulo 2. Phytostimulation and root architecture reconfiguration by *Azospirillum brasilense* Sp245 in *Arabidopsis* on different interaction systems involve elements in the auxin and ethylene signaling pathways.

Capítulo 3. *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharides induce Target of Rapamycin signaling and growth in *Arabidopsis thaliana*.

Capítulo 4. Resultados adicionales.

Plant Science 293 (2020) 110416

Contents lists available at ScienceDirect

Plant Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/plantsci

TARGET OF RAPAMYCIN signaling plays a role in *Arabidopsis* growth promotion by *Azospirillum brasilense* Sp245

Manuel Méndez-Gómez, Elda Castro-Mercado, César Arturo Peña-Uribe, Homero Reyes-de la Cruz, José López-Bucio, Ernesto García-Pineda*

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, Edif. A1´, Morelia, Michoacán CP 58040, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:
Target of rapamycin
Azospirillum brasilense
Arabidopsis thaliana
Auxin
Plant growth
Rhizobacteria

ABSTRACT

Azospirillum brasilense colonizes plant roots and improves productivity, but the molecular mechanisms behind its phytostimulation properties remain mostly unknown. Here, we uncover an important role of TARGET OF RAPAMYCIN (TOR) signaling on the response of *Arabidopsis thaliana* to *A. brasilense* Sp245. The effect of the bacterium on TOR expression was analyzed in the transgenic line *TOR/tor-1,* which carries a translational fusion with the GUS reporter protein, and the activity of TOR was assayed thought the phosphorylation of its downstream signaling target S6K protein. Besides, the role of TOR on plant growth in inoculated plants was assessed using the ATP-competitive inhibitor AZD-8055. A decrease in growth of the primary root correlates with an improved branching and absorptive capacity via lateral root and root hair proliferation 6 days after transplant to different concentrations of the bacterium (10^3 or 10^5 CFU/mL). Bacterization increased the expression of TOR in shoot and root apexes and promoted phosphorylation of S6K 3 days after transplant. The TOR inhibitor AZD-8055 (1 μM) inhibited plant growth and cell division in root meristems and in lateral root primordia, interfering with the phytostimulation by *A. brasilense*. In addition, the role of auxin produced by the bacterium to stimulate TOR expression was explored. Noteworthy, the *A. brasilense* mutant FAJ009, impaired in auxin production, was unable to elicit TOR signaling to the level observed for the wild-type strain, showing the importance of this phyhormone to stimulate TOR signaling. Together, our findings establish an important role of TOR signaling for the probiotic traits elicited by *A. brasilense* in *A. thaliana.*

1. Introduction

Azospirillum belongs into a group of well-known plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with great potential to improve yield worldwide [1]. This genus contains nitrogen-fixing, free living bacteria that associates with plant roots and influence growth and developmental processes via production of phytohormones such as the auxin indole 3-acetic acid (IAA) [1], cytokinin [2,3], abscisic acid (ABA), ethylene, gibberellic acid (GA_3) and zeatin [4]. However, the molecular mechanisms by which plants sense and respond to these bacteria are largely unknown.

An unexplored pathway in plant-*Azospirillum* interaction involves the target of rapamycin (TOR) protein kinase, which has an important role in controlling cell growth in eukaryotes. TOR belongs to the phosphatidyl-inositol 3-kinase-related protein kinase family known to assemble two multi-protein complexes in yeast and animals, TORC1 and TORC2 (TOR Complex 1 and 2). Both complexes contain TOR and LST8 (Lethal with SEC Thirteen protein 8), but have different associated regulatory subunits. TORC1 contains RAPTOR (Regulatory Associated Protein of TOR), whereas TORC2 contains RICTOR (Rapamycin-Insensitive Companion of TOR) and SIN1 (SAPK-Interacting Protein 1) [5].

In plants, there is evidence for the existence of only the TORC1 complex [6], and in the *Arabidopsis* genome, TOR is present as a single gene and knockouts that produce *tor* null mutants cause death at the embryo stage, which underlies its importance for plants [7,8]. Accordingly, TOR is highly expressed in plant embryos and meristems, as well as in cell proliferating tissues [7,9–11]. Meanwhile, the other two TORC1 components, RAPTOR and LST8 are each encoded by two genes with redundant functions, since their mutation did not compromise plant viability [9,11].

Several studies documented the pivotal roles for TOR in regulating metabolism, translation and transcription, which control cellular proliferation, development and growth via phosphorylation of downstream

* Corresponding author.
E-mail address: egpineda@umich.mx (E. García-Pineda).

https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110416
Received 6 August 2019; Received in revised form 16 December 2019; Accepted 19 December 2019
Available online 21 January 2020
0168-9452/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

targets [12,13]. In addition, TOR can enter the nucleus and directly interact with *rRNA* gene promoters to induce expression required for ribosome biogenesis [14]. In plants as in other eukaryots, the TOR complex drives growth in response to nutrients, light, energy resources and phytohormones [15,13]. The downstream activity of this complex depends on the direct phosphorylation of S6 kinase (S6K) and its substrate, the ribosomal protein S6 (RPS6), as well as the translational repressors 4E-binding proteins (4EBPs), which dissociate from eIF4E to initiate protein translation [16]. In both plants and mammals, the main targets of TOR are S6K1 and S6K2 [17].

The phytohormone auxin activates TOR in shoots and roots [18–20] and also promotes S6K phosphorylation in cell culture suspensions as well as phosphorylation of the ribosomal protein S6 [21]. In *Arabidopsis*, TOR is an essential factor for auxin signal transduction [22]. However, TOR signaling in the context of interactions between plants and microorganisms is poorly understood and most studies have focused on its role in plant defense. An increased TOR activity is associated with susceptibility to pathogens, suggesting that it acts as a repressor of disease resistance, perhaps it may compensate growth and development in response to attackers [23,24].

The *Azospirillum-Arabidopsis* interaction enabled to uncover the early molecular responses of plants to this rhizobacterium. *A. brasilense* increase plant biomass, stimulates photosynthesis and alters root architecture via changes in lateral roots and root hairs, this later aspect tightly correlated with auxin signaling and expression of hormone and defense-related genes [2526]. Currently, whether TOR mediates biochemical and molecular responses of plants to probiotic bacteria such as *A. brasilense* is unclear. To fill this gap, in this study we analyzed the effect of *A. brasilense* Sp245 inoculation on TOR expression and activity in *A. thaliana* morphogenesis, which unravel its critical function in root architecture and growth promotion, possibly related to an auxin response.

2. Materials and methods

2.1. Arabidopsis growth

Wild-type *Arabidopsis thaliana* (Columbia ecotype), and transgenic line *pCycB1;1::uidA* [27] were used in this study, as was *TOR/tor-1* (Wassilewskija ecotype) [7]. The *tor-1* allele carries a translational fusion between the TOR N-terminal sequence and GUS. *TOR/tor-1* was a generous donation from Dr. Benoît Menand (Aix Marseille Université, CEA, CNRS, BIAM, Laboratoire de Génétique et Biophysique des Plantes, Marseille, France).

Seeds were surface-disinfected with 95 % (vol/vol) ethanol for 5 min, and 20 % (vol/vol) bleach (Cloralex) for 5 min, before washing five times with sterilized distilled water and storage at 4 °C for 2 days. Seeds were germinated and grown on agar plates containing 0.2X Murashige and Skoog (MS) medium [28], pH 7 containing 0.9 g/L MS salts, 0.6 % (w/v) sucrose and 10 g/L Agar Plant TC (PhytoTechnology Laboratories, St. Lenexa, KS, USA). Plants were then placed vertically into a growth chamber (Percival Scientific AR-95 L) at 22 °C with photoperiod of 16 h light, 8 h darkness and light intensity of 100 μmol m^{-2} s^{-1}. All reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA).

2.2. Bacterial culture

Wild-type *Azospirillum brasilense* Sp245 [29] used in this study was kindly provided by Dr. Gladys Alexandre (University of Tennessee, USA) and the mutant *A. brasilense ipdC* FAJ009 was gifted by Dr. Yoav Bashan of the Environmental Microbiology Group from the Northwestern Center for Biological Research (CIBNOR, La Paz, B.C.S., México). Bacteria were maintained in solidified LB medium, pH 7 (10 g/L peptone, 5 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl, supplemented with 0.3009 g/L $MgSO_4$ and 0.277 g/L $CaCl_2$, 15 g/L agar was added). To prepare the inoculum, the bacteria were treated according to Spaepen et al. [30]. Briefly, a pre-inoculum was first established taken a colony from a fresh culture and inoculating in 3 mL of liquid LB medium. The culture was incubated for 16 h (~ 1.0 OD_{600} nm at 28 °C, with rotation at 140 rpm. After that, 150 μL of the pre-inoculum was transferred in 50 mL of liquid LB medium and incubated for 16 h at 28 °C, with rotation at 140 rpm. Bacterial cultures were centrifuged at 3800 *g* for 12 min at room temperature. The pellet was washed with 0.85 % NaCl, resuspended in 0.01 M $MgSO_4$, and adjusted using sequential dilutions to yield the desired final concentration of colony-forming units (CFU)/mL for its use.

2.3. Seedling interaction with A. brasilense

For the plant-bacteria interaction, different volumes of an inoculum stock containing 10^9 CFU/mL were taken and mixed with 32 ml 0.2X MS medium (37 °C ~ 39 °C) to reach the final concentrations of 10^3 or 10^5 CFU per mL of medium. The mixture was allowed to solidify. As a control, Petri dishes were prepared to contain the same medium plus a similar volume of $MgSO_4$ (0.01 M). Four days after germination, seedlings were aseptically transplanted to Petri dishes containing medium with or without bacteria. The plates were sealed with Parafilm, and incubated vertically in a plant growth chamber, as described above.

Root colonization was analyzed in roots of seedlings 6 d after bacterization (10^3 CFU/mL). Roots were separated from the foliage with a sterile scalpel and transferred to Eppendorf tubes containing 500 μL liquid LB medium and shaking in vortex for 10 min. 100 μL of the medium was distributed in Petri dishes containing solidified LB medium, incubated for 48 h at 28 °C, and the CFU was analyzed.

For inhibitor treatments, four days after germination seedlings were transplanted to Petri dishes containing 0.2X MS medium supplemented with a final concentration of 1 μM [31] of the inhibitor AZD-8055, which was previously prepared as a 10 mM stock solution in dimethyl sulfoxide (DMSO) (100 μL of the stock were added to 100 mL warm MS medium, distributed in Petri dishes and allowed to solidify). Equal volumes of DMSO were added for the control. To analyze the effect of AZD-8055 on *A. brasilense*, bacteria were grown 24 h in liquid LB medium supplemented with 1 μM of the inhibitor and the CFU/mL were determined.

2.4. Analysis of plant growth parameters

Plant growth parameters were analyzed 6 days after transplant. The fresh weight was determined using an analytical balance (Ohaus V14130 Voyager) and the growth of primary roots was measured with a ruler. The lateral roots number was determined using a stereoscopic microscope (Leica MZ6) to count the lateral roots present in the primary root from the tip to root/stem transition. Lateral root density (LRD) was obtained by dividing the number of lateral roots by the length of the primary root and was expressed as LRD cm^{-1}. Analysis of lateral root primordia (LRP) development was conducted 3 days after transplant. The different developmental stages were considered as follows: Stage I: LRP initiation is characterized by the appearance of closely-spaced cell walls in the pericycle layer oriented perpendicular to the root axis. Stage II: LRP is divided periclinally to form two layers (outer layer (OL) and inner layer (IL)). Stage III: The OL continues dividing to generate a three layer primordium. Stage IV: The IL divides to create four cell layers and the LRP penetrates the parent endodermal layer. Stage V: After a series of divisions, the LRP penetrates midway through the parent cortex. Stage VI: LRP begins to resemble the mature root tip and the LRP has passed through the parent cortex layer to penetrate the epidermis. Stage VII: The LRP begins to emerge from the parent root.

Root hairs were photographed and analyzed using a stereoscopic microscope and root hair number was determined by counting the root hairs in a 1 mm section of the primary root. To analyze the primary root

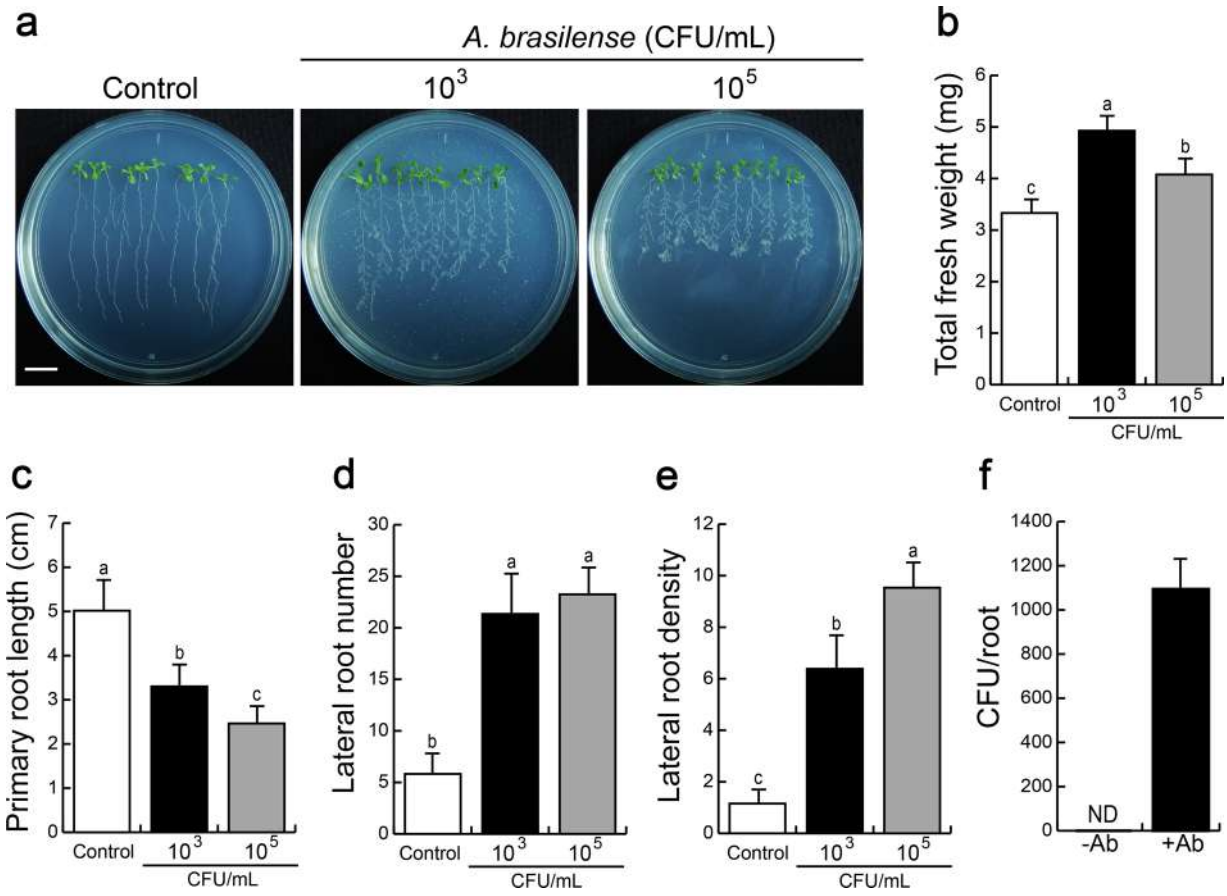


Fig. 1. Effect of *A. brasilense* on *A. thaliana* growth. **a**. Morphological effects of different *A. brasilense* concentrations on seedlings. **b-e**. Growth parameters analyzed in bacterized seedlings. **f**. Root colonization after transplant (10^3 CFU/mL). Scale bar = 1 cm. The fresh weight was obtained from three groups of 10 plants each and the other parameters were obtained from individual seedlings (n = 30). ND = Not detected. The letters on the bars indicate significant differences (*Tukey's HSD test; $P < 0.05$*).

meristem, plants were clarified [32] and analyzed with a microscope (Nomarski optics, Leica DFC450C). The meristem length was defined as the distance between the quiescent center and the first cell of the cortex that begins to elongate. Digital images obtained from the roots were analyzed with ImageJ software (https://imagej.nih.gov/ij/).

2.5. TOR expression and cell division

TOR expression and cell division were evaluated using the transgenic plants *TOR/tor-1* and *pCycB1;1::uidA*, respectively. The analysis was performed 1, 3 or 6 days after transplant to agar solidified 0.2X MS medium containing 10^3 CFU/mL of the rhizobacterium. Transgenic lines expressing the *uidA* reporter gene were stained with 0.1 % X-Gluc (5-bromo-4-chlorium 3-indolyl, β-D-glucuronide) dissolved in phosphate buffer (NaH_2PO_4 and Na_2HPO_4, 0.1 M, pH 7), with 2 mM potassium ferrocyanide and 2 mM potassium ferricyanide overnight at 37 °C, except for *TOR/tor-1*, which was stained for 10 h. For the analysis, plants were cleared and fixed as previously described [32], and mounted on glass slips and sealed with commercial nail varnish before observation and imaging in the microscope (Nomarski optics, Leica DFC450C). GUS staining intensity was quantified from the photographs taken using ImageJ according to Béziat et al. [33]. *TOR::GUS* expression intensity was quantified within a rectangle of 50 × 400 μm, starting from the quiescent center and covering the transition and elongation zone.

To analyze the effect of auxin produced by the rhizobacterium on TOR expression, transgenic *Arabidopsis* were transplanted into agar solidified 0.2X MS medium added with 10^3 CFU/mL of the mutant *A. brasilense ipdC* FAJ009, or supplemented with 1 μM indole-3-acetic acid (IAA) [34] as a positive control of TOR induction.

For *CYCB1::GUS* staining analysis, a square of 100 × 100 μm was drawn from the middle of the meristem.

2.6. TOR activity analysis

TOR activity was analyzed by examining phosphorylation of the S6K protein. Plant tissues 100 mg were crushed in liquid nitrogen and re-suspended in 100 μl extraction buffer containing 50 mM HEPES, pH 7.6, 1 mM sodium vanadate, 1 mM sodium molybdate, 1 mM benzamidine, 20 mM NaF, 0.2 mM PMSF in methanol, and 2 mM DTT. The sample was homogenized using a Vortex before centrifugation at 9000 rpm for 30 min and 4 °C. The supernatant was transferred to a sterile Eppendorf tube. Total protein content was determined by the Bradford assay [35] and a sample (20 μg) was resolved and separated by SDS-PAGE (12 %) before transfer to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane. The membrane was washed for 10 min with 0.15 M TBS-T buffer (50 mM Tris – HCl, 0.15 M NaCl, 0.1 % Tween 20, pH 7.4). Blots were blocked overnight with constant shaking in 5 % skim milk in TBS-T and detected with mouse monoclonal antibodies anti-p70 S6 kinase α, and phospho-p70 S6 kinase α Santa Cruz Biotechnology as the primary antibody, diluted at 1:5000. The membrane was washed for 5 min at 4 °C in shaking, first with 0.15 M TBS-T, then with 1 M TBS-T, and finally with 0.15 M TBS-T. The membrane was then incubated with a dilution of 1:10,000 anti-mouse IgG (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) as the secondary antibody, dissolved in 0.15 M TBS-T, for 2 h at 4 °C with constant shaking. The membrane was washed 3 times for 5 min each

with 0.15M TBS-T and developed with WesternSure PREMIUM Chemiluminescent Substrate (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) to detect horseradish peroxidase activity. The images were taken with a ChemiDoc™MP Imaging System [36].

2.7. Statistical analysis

All experiments were repeated at least three times and yielded similar results. The data were analyzed using the STATISTICA program version 8.0.550. Univariate and multivariate analyses followed by a *post-hoc* test (Tukey's HSD) were used for testing differences between treatments.

3. Results

3.1. A. brasilense Sp245 improves growth of A. thaliana

To examine the effect of *A. brasilense* Sp245 on *A. thaliana*, 3 d-old seedlings were transplanted into agar solidified 0.2X MS medium containing 10^3 or 10^5 CFU/mL of the rhizobacterium, and growth parameters were analyzed 6 d after transplant. Both bacterial concentrations influenced plant growth (Fig. 1a). The total fresh weight was notably increased but conversely, decreased growth of primary roots could be observed at 10^3 CFU/mL. Lateral root number and density were sharply increased at both bacterial concentrations, with a major increase in lateral root density at 10^5 CFU/mL (Fig. 1b-e). Root colonization was confirmed 6 d after transplant to an inoculum concentration of 10^3 CFU/mL. (Fig. 1f).

Detailed analysis of root morphology indicated that both bacterial concentrations notably increased root hair number and length (Fig. 2a-c). Seedling foliage was also modified in a manner that petiole length, leaf width and total leaf number were higher in bacterized seedlings (Supplementary Fig. S1).

Chlorophyll content was quantified in the foliage and biochemical changes in metabolism that could mediate plant growth were also analyzed. The amount of chlorophyll *a* and *b* as well as total chlorophyll was increased in bacterized seedlings (Supplementary Fig. S1).

Overall, these data show the probiotic effects of *A. brasilense* Sp245 in *Arabidopsis*.

3.2. A. brasilense increases TOR expression in root meristems

TOR expression was monitored at different times in non-bacterized and bacterized *Arabidopsis* seedlings using the *TOR::GUS* fusion protein in transgenic lines that express this construct [7]. In foliage of non-bacterized seedlings, TOR expression was detected in the shoot apical meristem and in young leaves. *A. brasilense* increased TOR expression in these tissues (Fig. 3a). In the root meristem, TOR expression progressively increased with age in non-bacterized seedlings. In bacterized seedlings, TOR expression was stimulated 3 d after transplant when compared to non-bacterized seedlings. At 6 d after transplant, the root meristem size decreased, whereas the number of lateral roots increased in response to bacterization. During this period, GUS expression was confined to the root tip and developing lateral root tips.

The relative analysis of GUS expression area showed that the rhizobacteria notably increased the area of expression in the root meristem (Fig. 3b-d). These data indicate the transcriptional induction of *TOR* in *Arabidopsis* in response to *A. brasilense* Sp245.

3.3. Analysis of TOR activity by S6K phosphorylation

The effect of *A. brasilense* on TOR activity was analyzed by measuring levels of phosphorylated S6K, a downstream effector of the pathway, at different times after transplant to medium with the rhizobacterium. The level of S6K phosphorylation increased in shoot and root 1, 3 and 6 d after bacterization, relative to the non-bacterized control (Fig. 4a). The ATP-competitive TOR inhibitor AZD-8055 decreased the level of S6K phosphorylation in presence of *A. brasilense* (Fig. 4b), but not to the level reached by the inhibitor alone, suggesting the activation of other mechanism(s) related with the S6K phosphorylation. Thus, S6K phosphorylation is consistent with an activation of TOR signaling in *Arabidopsis* as a response to *A. brasilense* Sp245.

3.4. TOR inhibitor AZD-8055 interferes with A. brasilense probiotic effects in Arabidopsis

The role of TOR in plant growth stimulated by *A. brasilense* was further analyzed using AZD-8055. At 4 d after germination in the absence of inhibitor, seedlings were transferred to a medium containing the inhibitor (1 μM) and allowed to grow for 6 additional days, and growth parameters registered. AZD-8055 treatment decreased plant growth relative to control plants (Fig. 5a). Total fresh weight and primary root length decreased with inhibitor treatment in the presence of the rhizobacterium. Meanwhile, the lateral root number and lateral root density were stimulated by *A. brasilense* and in the presence of the inhibitor, although not to the level stimulated by the rhizobacterium alone (Fig. 5b-e). The inhibitor did not affect *A. brasilense* growth (Fig. 5f).

The effects of AZD-8055 and the bacterium were analyzed in detail by examining root morphology. Root hair number and length decreased with the combined treatments, but the inhibition was not as complete as that seen for treatment with the inhibitor alone (data not shown). These results show the antagonism of pharmacological inhibition of TOR and growth and developmental responses of *Arabidopsis* to *A. brasilense* Sp245.

3.5. Effect of TOR inhibition on cell division in root meristems in bacterized plants

Expression of *CYCB1;1::GUS* was tested to analyze the effect of TOR inhibition on cell division in bacterized plants. Cell division was stimulated by the rhizobacterium 3 d after transplant and then decreased at 6 d when compared to the non-bacterized control. Treatment with inhibitor AZD-8055 decreased cell division and meristem length at all analyzed time points. Interestingly, cell division slightly recovered with rhizobacterial inoculation (Fig. 6a-c).

The effect of AZD-8055 on TOR expression and cell division during lateral root formation was also analyzed 3 d after transplant. *Azospirillum* stimulated a substantial increase in the formation of lateral root primordia, mainly at early stages. In contrast, AZD-8055 inhibited lateral root initiation and emergence; a process that could be stimulated by the rhizobacterium (Supplementary Fig. 2).

To examine whether TOR inhibition and the concomitant inhibition of lateral root primordia development could be related to cyclin expression, we examined *TOR::GUS* and *CYCB1;1::GUS* expression in bacterized plants. AZD-8055 inhibited the expression of both proteins, and when the rhizobacterium was added in combination with AZD-8055 a recovery in the expression levels was observed (Supplementary Fig. 2). These data indicate that TOR signaling has a role for lateral root formation in bacterized plants.

3.6. Activation of TOR expression by A. brasilense-mediated auxin production

To analyze the mechanism by which *A. brasilense* activates TOR expression, the role of the auxin indole-3-acetic acid (IAA) produced by the rhizobacterium was assessed by examining changes in foliage and measuring *TOR::GUS* expression in *A. thaliana* bacterized with wild-

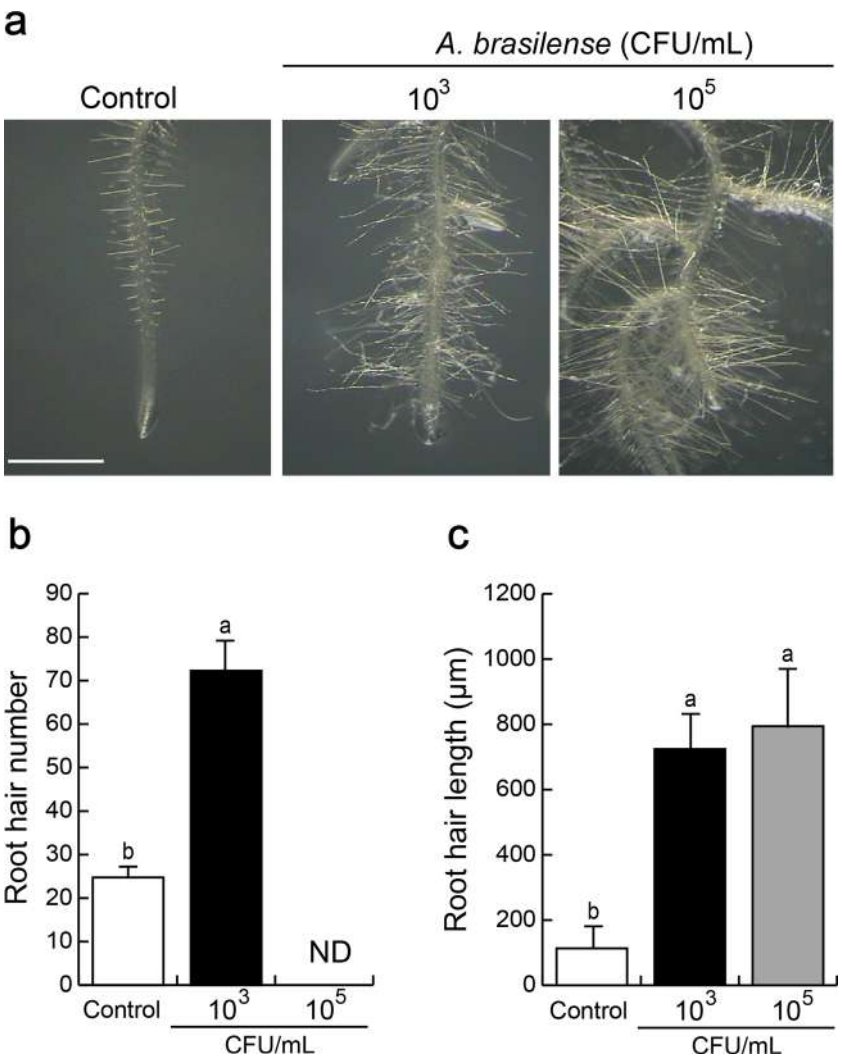


Fig. 2. Root hair formation in response to *A. brasilense*. **a**. Morphology of the main root. **b**,**c**. Effect of the rhizobacteria on the number (n = 30) and length (n = 300) of root hairs. ND = Not determined. Scale bar =1 mm. The letters on the bars indicate significant differences (*Tukey's HSD test; P < 0.05)*.

type Sp245 or FAJ009, a strain having impaired auxin production, or treated with exogenous IAA. At 3 and 6 d after transplant with wild-type Sp245 or after IAA treatment, an increase in the foliage size was observed. Plants bacterized with FAJ009 did not have differences in foliage size relative to non-bacterized plants. Moreover, increased *TOR::GUS* expression was clearly observed with wild-type Sp245 or with IAA treatment, but with FAJ009 the expression level was comparable to the control. Similar results were observed in the root meristem wherein the wild-type Sp245 strain clearly increased *TOR::GUS* expression and following FAJ009 bacterization the expression level was similar to the control (Fig. 7a-c). Taken together, the results suggest that plant growth is promoted by *A. brasilense* and that TOR expression is regulated by auxin produced by the rhizobacterium.

4. Discussion

The rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 induces morphological and physiological changes of host root systems as well as increases lateral root proliferation and elongation. In this manner, it enhances the capacity of plants to access nutrients and water [37]. *A. brasilense* also stimulates plant growth by producing phytohormones, especially indole-3-acetic acid (IAA) [38].

The TOR protein kinase plays key roles in regulating metabolism and gene transcription and translation to regulate cellular proliferation and growth [12,13,17]. However, an understanding of the molecular and cellular mechanisms by which plant TOR kinase specifically transduces signals, such as those arising from phytohormones, is just emerging. Although rhizobacteria are predicted to affect plant TOR pathway activity, a specific connection between *A. brasilense* and the TOR pathway had not been reported. The results of this study clearly indicated that TOR activity plays a key role in plant growth promotion by *A. brasilense*.

The rhizobacterium increased TOR expression in the shoot and root meristem, showing that this pathway is activated. This result also suggests that plant growth seen after *A. brasilense* bacterization is, at least in part, promoted through activation of the TOR pathway, and is consistent with previous reports showing that TOR levels increase during plant growth in plant roots and shoot meristems [19].

A. brasilense bacterization also resulted in probiotic effects in *A. thaliana* seedlings, which was associated with increased chlorophyll content and in this manner it could provide metabolites needed to carry out anabolic reactions required to boost plant growth. In this regard, TOR is thought to be involved in chloroplast biogenesis and maturation that promote leaf greening. Chloroplast biogenesis and maturation are

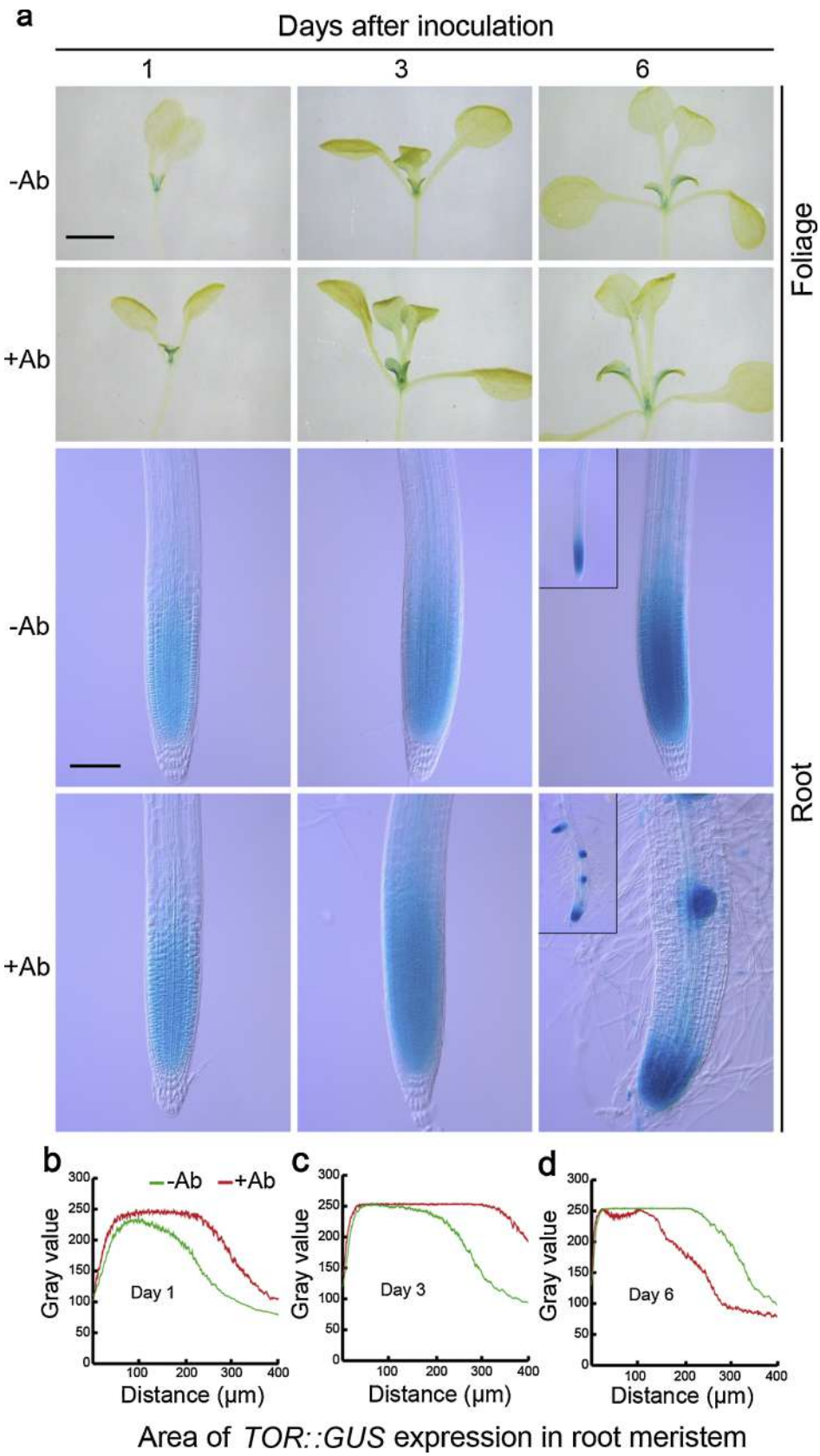


Fig. 3. *TOR::GUS* expression in seedlings bacterized with *A. brasilense*. **a**. *TOR::GUS* expression in shoots and primary root meristems at different times after transplant. **b**-**d**. Quantification of staining intensity in the primary root meristem (n = 5). Plants were bacterized with 10^3 CFU/mL. Ab = *A. brasilense*. Scale bar = 1 mm and 100 μm for foliage and root, respectively.

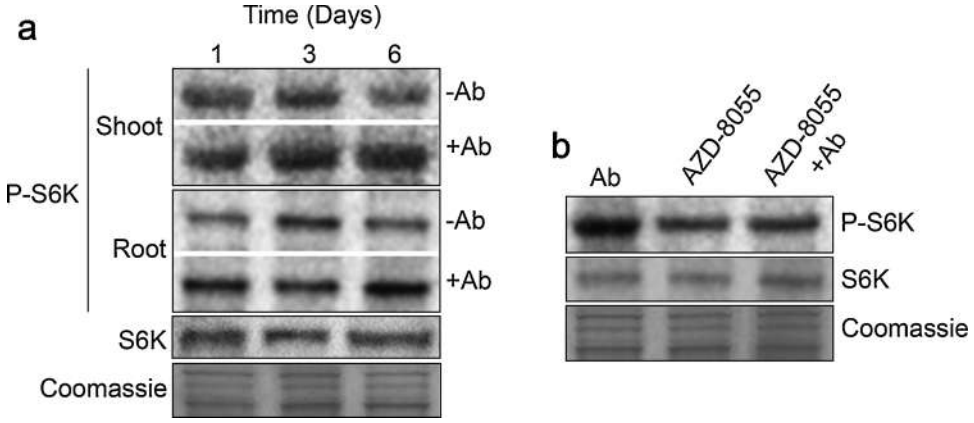


Fig. 4. Effect of *A. brasilense* on TOR activity. **a**. S6K phosphorylation in shoot and root at different times after transplant. **b**. Effect of the TOR inhibitor AZD-8055 on S6K phosphorylation 6 d after transplant. Plants were bacterized with 10^3 CFU/mL rhizobacteria. The experiment was repeated three times with similar results. Ab = *A. brasilense*.

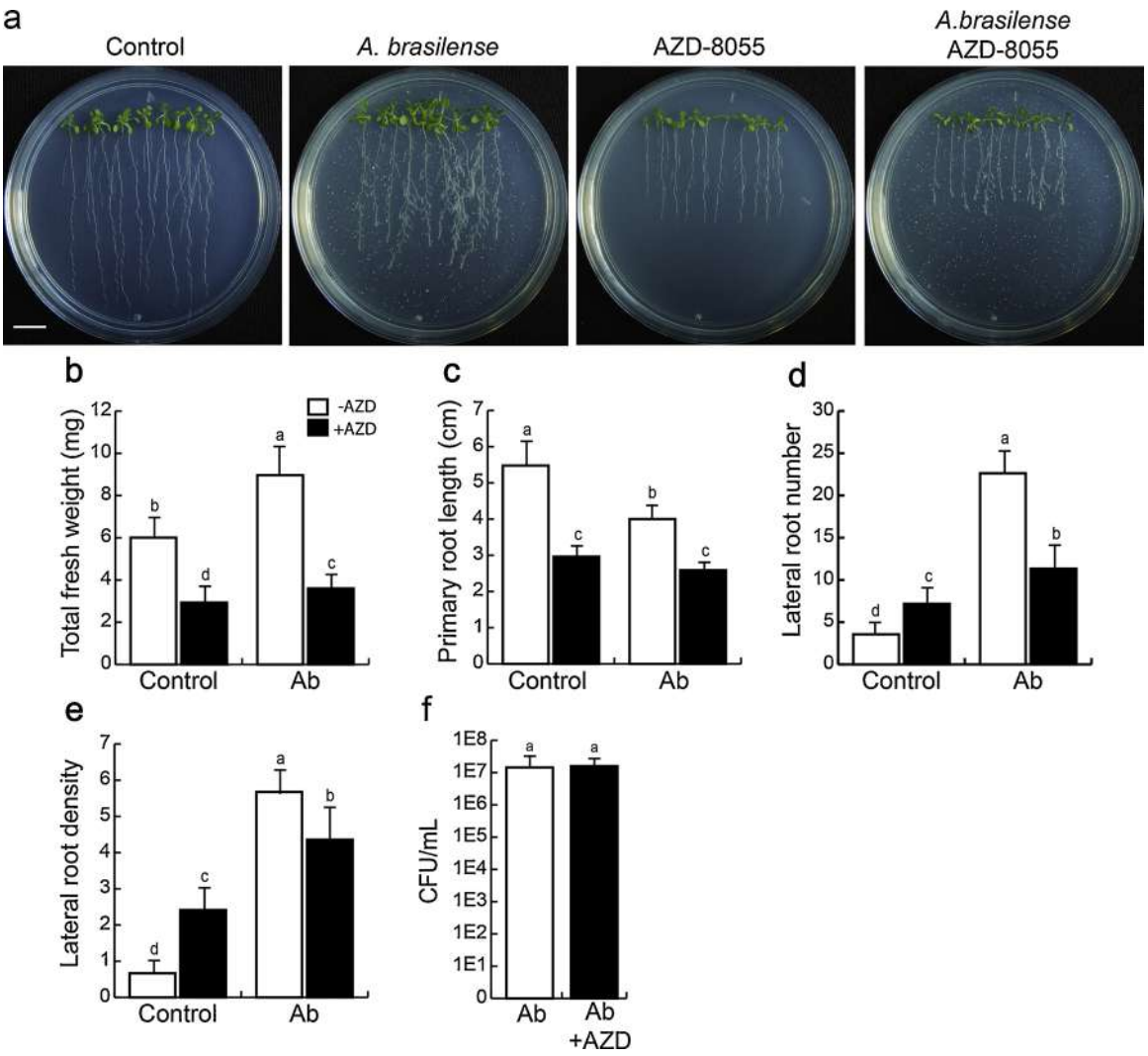


Fig. 5. Effect of TOR inhibition on *A. thaliana* growth. **a**. Morphological effects of the TOR inhibitor AZD-8055 (1 μM) on seedlings. **b-e**. Growth parameters analyzed in seedlings. **f**. Effect of AZD-8055 on *A. brasilense*. Plants were bacterized with 10^3 CFU/mL. Ab = *A. brasilense*. N = 30. Scale bar = 1 cm. The letters on the bars indicate significant differences (*Tukey's HSD test; $P < 0.05$*).

processes that depend on light and result in efficient photosynthesis during leaf development [13,39–41]. Here, inhibition of TOR with the chemical inhibitor AZD-8055 decreased leaf greening and consequently plant growth, which is consistent with repressed expression of genes involved in chlorophyll biosynthesis [42,43].

In addition to increased TOR expression, *A. brasilense* promoted TOR activity, as shown by the induction of phosphorylation of S6 kinase (S6K), a canonical downstream target of TOR. S6K stimulates protein synthesis by phosphorylating ribosomal S6 proteins and the protein phosphatase 2A regulatory subunit TAP46, which regulates cell growth [15].

With regard to the molecular mechanisms influencing TOR activity in plants, TOR is activated by the phytohormone auxin in shoot apexes where it promotes development of true leaves [19]. Auxin produced by

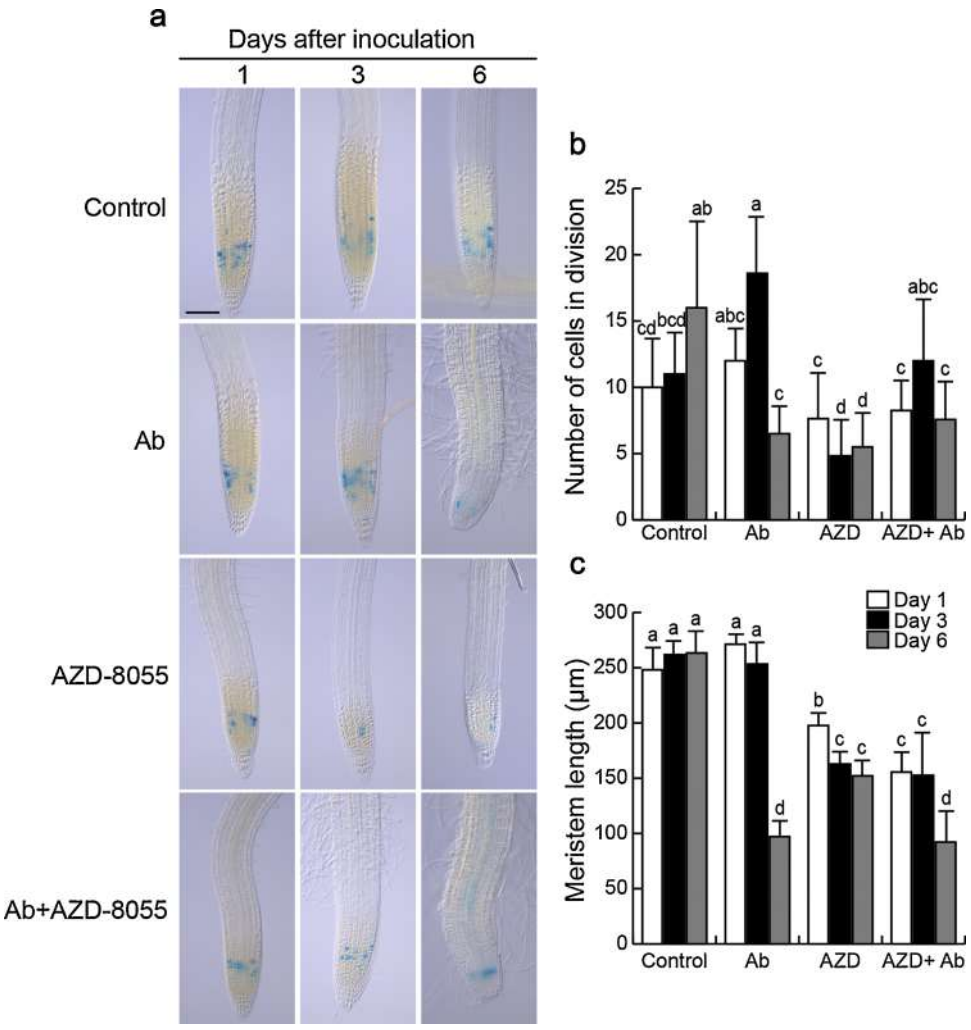


Fig. 6. Effect of AZD-8055 on cell division in the root meristem. **a**. *CYCB1;1::GUS* expression in the root meristem at different times after AZD-8055 (1 µM) treatment. **b, c**. Number of dividing cells in the root meristem and root meristem length. Plants were bacterized with 10^3 CFU/mL. Ab = *A. brasilense*. N = 15. Scale bar = 1 µm. The letters on the bars indicate significant differences (*Tukey's HSD test; P < 0.05*).

rhizobacteria also plays an important role to activate TOR since the strain *A. brasilense* FAJ009, which has an impaired auxin production, did not increase TOR expression to the level observed for the wild-type strain. Thus, auxin either produced by the rhizobacteria or the plant contributes to activation of the TOR pathway.

TOR integrates other signals such as glucose and light to promote leaf development. The effect of light on TOR activation is likely mediated via the stimulation of auxin biosynthesis via expression of auxin biosynthesis genes, *YUC2, YUC4* and *YUC7*, in the shoot apex [19]. The increase in chlorophyll content in response to *A. brasilense* may enhance photosynthesis, and consequently glucose production. In addition to auxin produced by the rhizobacteria, glucose biosynthesized in leaves of inoculated seedlings and transported to the root meristem could promote TOR expression. This possibility is supported by reports showing that TOR is activated by glucose in root apexes [19].

Some molecular elements of the signal transduction to activate TOR pathway have been characterized, such as the small GTPase Rho-related protein 2 (ROP2), a protein which transduces light and auxin signals in shoot apexes that directly activate TOR. ROP2 are a ubiquitous eukaryotic family of molecular switches within the RAS superfamily of monomeric GTPases. In plants, Rho family members are involved in root hair development [19,44–47]. However, whether *A. brasilense* can directly activate ROP2 is unknown.

Interestingly, meristem cell division and root hair growth were slightly recovered by the rhizobacterium in seedlings treated with the TOR inhibitor AZD-8055, which suggest an alternate pathway to promote changes related with plant growth. The production of signaling lipids as second messenger by phospholipases could be another pathway mediating phytostimulation by rhizobacteria because phosphatidic acid (PA), produced by phospholipase D (PLD), activates the PHOSPHOLIPID-DEPENDENT PROTEIN KINASE 1 (PDK1) [48]. PDK1 can directly activate S6K, or in convergence with TOR [49].

Despite the increasing number of reports showing an essential role for TOR as a master regulator of plant growth and development, to our knowledge no previous studies examined how stimulation of TOR activity mediated by rhizobacteria contributes to growth of plants. The results of this study thus provide a foundation for detailed characterization of the role of TOR in plant-rhizobacteria interactions, and supports the further exploration of the mechanisms by which beneficial rhizobacteria promote plant growth.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

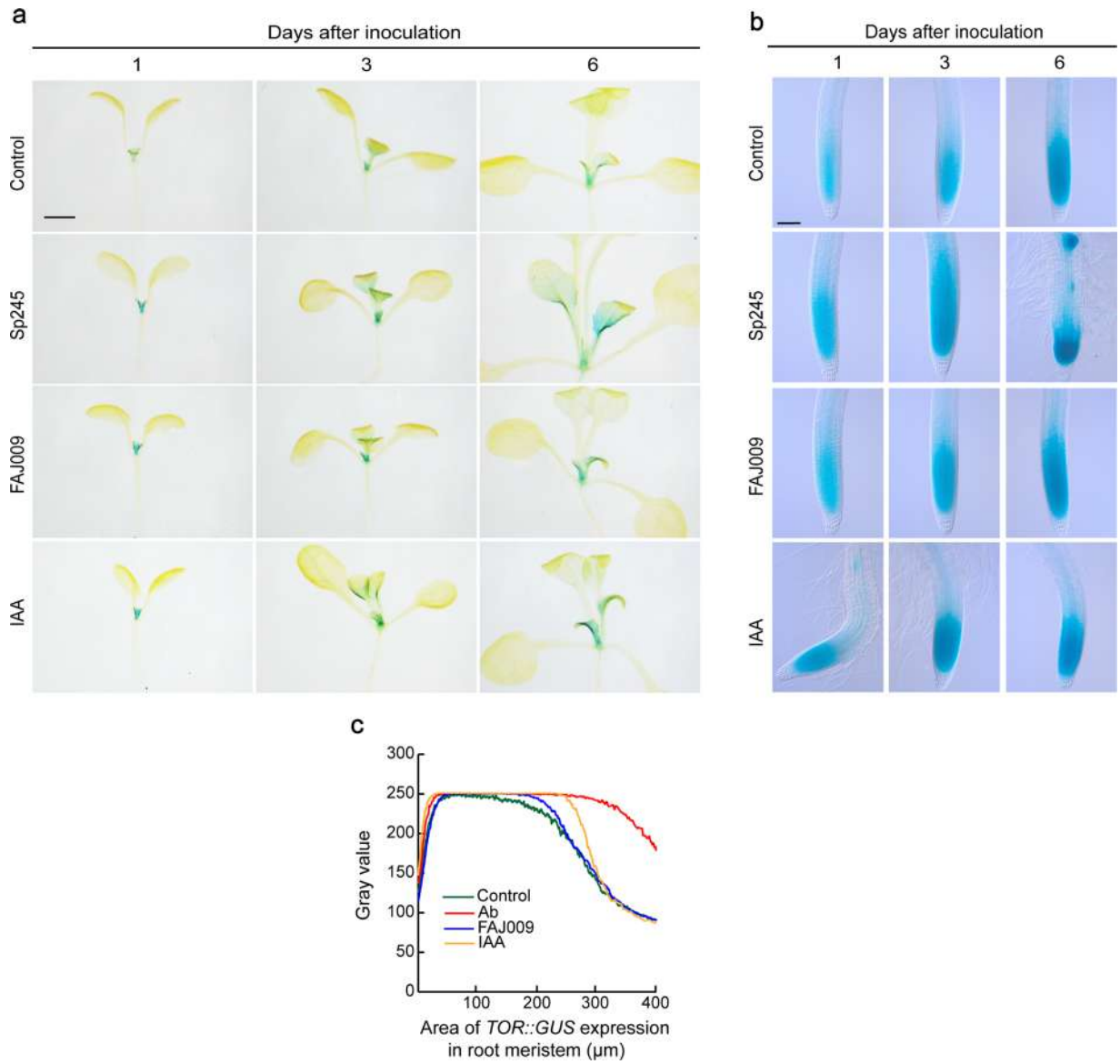


Fig. 7. *TOR::GUS* expression in response to auxins produced by *A. brasilense*. **a**. Expression in the shoot. **b**. Expression in the root meristem. **c**. Area of *TOR::GUS* expression in the root meristem. Plants were bacterized with 10^3 CFU/mL *A. brasilense*. IAA concentration was 0.1 μM. Experiments were repeated three times with similar results. Scale Bar = 1 mm and 100 μm for foliage and root, respectively.

Acknowledgments

The authors want to thank Omar González López for technical assistance in S6K phosphorylation analysis. This study was supported by the Coordinación de la Investigación Científica, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México, and CONACYT grant No. 222405. We are indebted to CONACYT for a Ph. D. fellowship (276783) to MMG.

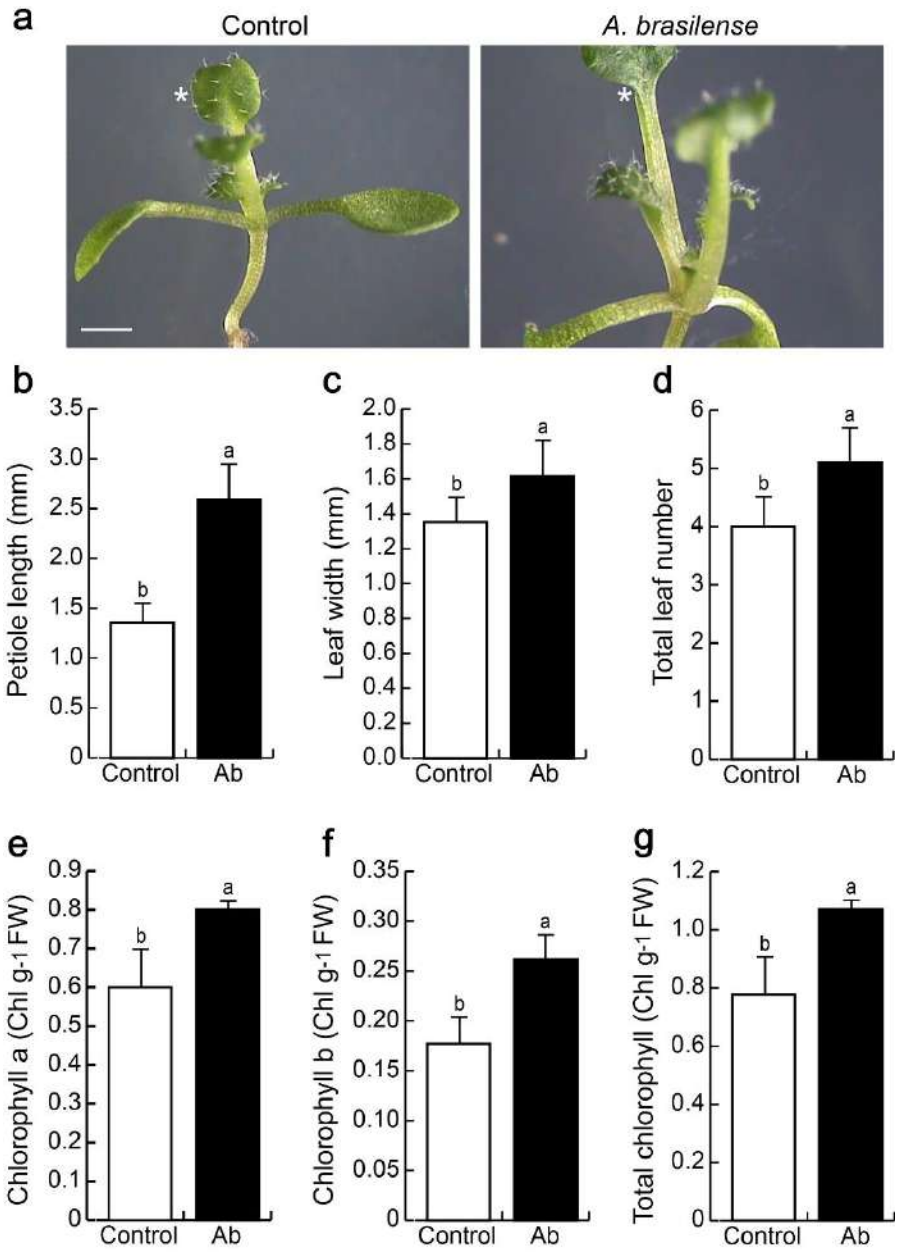
Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110416.

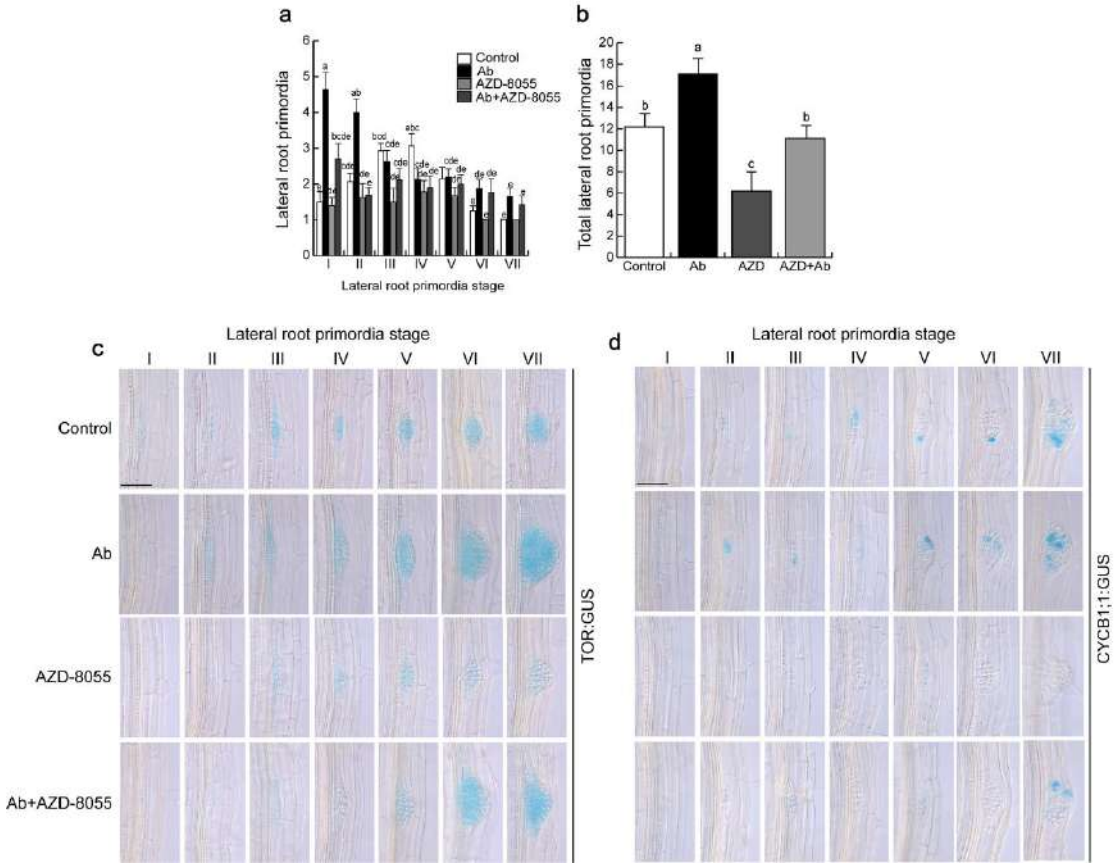
References

[1] Y. Bashan, G. Holguin, L.E. de-Bashan, *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003), Can. J. Microbiol. 50 (2004) 521–577.
[2] A. Hartmann, J. Baldani, The genus *Azospirillum*, in: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, E. Stackebrandt (Eds.), The Prokaryotes, Wiley, New York, 2003, pp. 114–140.
[3] O. Steenhoudt, J. Vanderleyden, *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects, FEMS Microbiol. Rev. 24 (2000) 487–506.
[4] T.M. Tien, M. Gaskins, D. Hubbell, Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.), Appl. Environ. Microbiol. 37 (1979) 1016–1024.
[5] R.A. Saxton, D.M. Sabatini, mTOR signaling in growth, metabolism, and disease, Cell 168 (2017) 960–976.
[6] T.J.P. van Dam, F.J.T. Zwartkruis, J.L. Bos, B. Snel, Evolution of the TOR pathway, J. Mol. Evol. 73 (2011) 209–220.
[7] B. Menand, T. Desnos, L. Nussaume, F. Berger, D. Bouchez, C. Meyer, C. Robaglia, Expression and disruption of the *Arabidopsis* TOR (target of rapamycin) gene, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99 (2002) 6422–6427.
[8] M. Ren, S. Qiu, P. Venglat, D. Xiang, L. Feng, G. Selvaraj, R. Datla, Target of rapamycin regulates development and ribosomal RNA expression through kinase domain in *Arabidopsis*, Plant Physiol. 155 (2011) 1367–1382.
[9] G.H. Anderson, B. Veit, M.R. Hanson, The *Arabidopsis* AtRaptor genes are essential for post-embryonic plant growth, BMC Biol. 3 (2005) 12.
[10] D. Deprost, H.N. Truong, C. Robaglia, C. Meyer, An *Arabidopsis* homolog of RAPTOR/KOG1 is essential for early embryo development, Biochem. Biophys. Res. Commun. 326 (2005) 844–850.
[11] M. Moreau, M. Azzopardi, G. Clément, T. Dobrenel, C. Marchive, C. Renne, M.L. Martin-Magniette, L. Taconnat, J.P. Renou, C. Robaglia, C. Meyer, Mutations

in the *Arabidopsis* homolog of LST8/GbetaL, a partner of the target of rapamycin kinase, impair plant growth, flowering, and metabolic adaptation to long days, Plant Cell 24 (2012) 463–481.
[12] M. Schepetilnikov, L.A. Ryabova, Recent discoveries on the role of TOR (Target of Rapamycin) signaling in translation in plants, Plant Physiol. 176 (2018) 1095–1105.
[13] L. Shi, Y. Wu, J. Sheen, TOR signaling in plants: conservation and innovation, Development 145 (2018) dev160887.
[14] M. Ren, S. Qiu, P. Venglat, D. Xiang, L. Feng, G. Selvaraj, R. Datla, Target of rapamycin regulates development and ribosomal RNA expression through kinase domain in *Arabidopsis*, Plant Physiol. 155 (2011) 1367–1382.
[15] T. Dobrenel, C. Caldana, J. Hanson, C. Robaglia, M. Vincentz, B. Veit, C. Meyer, TOR signaling and nutrient sensing, Annu. Rev. Plant Biol. 67 (2016) 261–285.
[16] B.D. Fonseca, E.M. Smith, N. Yelle, T. Alain, M. Bushell, A. Pause, The ever-evolving role of mTOR in translation, Sem. Cell Develop. Biol. 36 (2014) 102–112.
[17] Y. Xiong, J. Sheen, Rapamycin and glucose-target of rapamycin (TOR) protein signaling in plants, J. Biol. Chem. 287 (2012) 2836–2842.
[18] M. Schepetilnikov, M. Dimitrova, E. Mancera-Martínez, A. Geldreich, M. Keller, L.A. Ryabova, TOR and S6K1 promote translation reinitiation of uORF-containing mRNAs via phosphorylation of eIF3h, EMBO J. 32 (2013) 1087–1102.
[19] X. Li, W. Cai, Y. Liu, H. Li, L. Fu, Z. Liu, L. Xu, H. Liu, T. Xu, Y. Xiong, Differential TOR activation and cell proliferation in *Arabidopsis* root and shoot apexes, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 114 (2017) 2765–2770.
[20] M. Schepetilnikov, J. Makarian, O. Srour, A. Geldreich, Z. Yang, J. Chicher, P. Hammann, L.A. Ryabova, GTPase ROP2 binds and promotes activation of target of rapamycin, TOR, in response to auxin, EMBO J. 36 (2017) 886–903.
[21] F. Turck, F. Zilbermann, S.C. Kozma, G. Thomas, F. Nagy, Phytohormones participate in an S6 kinase signal transduction pathway in *Arabidopsis*, Plant Physiol. 134 (2004) 1527–1535.
[22] Y. Pu, X. Luo, D.C. Bassham, TOR-dependent and -independent pathways regulate autophagy in *Arabidopsis thaliana*, Front. Plant Sci. 8 (2017) 1204.
[23] D. De Vleesschauwer, O. Filipe, G. Hoffman, H.S. Seifi, A. Haeck, P. Canlas, J. Van Bockhaven, E. De Waele, K. Demeestere, P. Ronald, M. Hofte, Target of rapamycin signaling orchestrates growth-defense trade-offs in plants, New Phytol. 217 (2018) 305–319.
[24] L.V. Meteignier, M. El Oirdi, M. Cohen, T. Barff, D. Matteau, J.F. Lucier, S. Rodriguez, P.E. Jacques, K. Yoshioka, P. Moffett, Translatome analysis of an NB-LRR immune response identifies important contributors to plant immunity in *Arabidopsis*, J. Exp. Bot. 68 (2017) 2333–2344.
[25] J.G. Dubrovsky, M.E. Pljente, Y. Bashan, *Arabidopsis thaliana* as a model system for the study of the effect of inoculation by *Azospirillum brasilense* Sp-245 on root hair growth, Soil Biol. Biochem. 26 (1994) 1657–1664.
[26] S. Spaepen, S. Bossuyt, K. Engelen, K. Marchal, J. Vanderleyden, Phenotypical and molecular responses of *Arabidopsis thaliana* roots as a result of inoculation with the auxin-producing bacterium *Azospirillum brasilense*, New Phytol. 201 (2014) 850–861.
[27] A. Colon-Carmona, R. You, T. Haimovitch-Gal, P. Doerner, Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein, Plant J. 20 (1999) 503–508.
[28] T. Murashige, F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, Physiol. Plant. 15 (1962) 473–497.
[29] J.I. Baldani, V.L.D. Baldani, L. Seldin, J. Dobereiner, Characterization of *Herbaspirillurn seropedicae*gen. nov. sp. nov. a root-associated nitrogen-fixing bacterium, Int. J. Syst. Bact. 36 (1986) 86–93.
[30] S. Spaepen, S. Bossuyt, K. Engelen, K. Marchal, J. Vanderleyden, Phenotypical and molecular responses of *Arabidopsis thaliana* roots as a result of inoculation with the auxin producing bacterium *Azospirillum brasilense*, New Phytol. 201 (2014) 850–861.
[31] M.H. Montané, B. Menand, ATP-competitive mTOR kinase inhibitors delay plant growth by triggering early differentiation of meristematic cells but no developmental patterning change, J. Exp. Bot. 64 (2013) 4361–4374.
[32] J.E. Malamy, P.N. Benfey, Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*, Development 124 (1997) 33–44.
[33] C. Béziat, E. Barbez, M.I. Feraru, D. Lucyshyn, J. Kleine-Vehn, Light triggers PILS-dependent reduction in nuclear auxin signalling for growth transition, Nat. Plants 3 (2017) 17105.
[34] Z. Ding, J. Friml, Auxin regulates distal stem cell differentiation in *Arabidopsis* roots, Proc. Natl. Acad. Sci. 107 (2010) 12046–12051.
[35] M.M. Bradford, Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem. 72 (1976) 248–254.
[36] H. Reyes de la Cruz, R. Aguilar, E. Sánchez de Jiménez, Functional characterization of a maize ribosomal S6 protein kinase (ZmS6K), a plant ortholog of metazoan p70(S6K), Biochemistry 43 (2004) 533–539.
[37] A.E. Richardson, J.M. Barea, A.M. McNeill, C. Prigent-Combaret, Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms, Plant Soil 321 (2009) 305–339.
[38] C. Prigent-Combaret, D. Blaha, J.F. Pothier, L. Vial, M.-A. Poirier, F. Wisniewski-Dyé, Y. Moënne-Loccoz, Physical organization and phylogenetic analysis of acdR as leucine-responsive regulator of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase gene acdS in phytobeneficial *Azospirillum lipoferum* 4B and other proteobacteria, FEMS Microbiol. Ecol. 65 (2008) 202–219.
[39] B. Mohammed, S.F. Bilooei, R. Doczi, E. Grove, S. Railo, K. Palme, F.A. Ditengou, L. Bogre, E. Lopez-Juez, Converging light, energy and hormonal signaling control meristem activity, leaf initiation, and growth, Plant Physiol. 176 (2018) 1365–1381.
[40] F. Xiong, R. Zhang, Z. Meng, K. Deng, Y. Que, F. Zhuo, L. Feng, S. Guo, R. Datla, M. Ren, Brassinosteriod Insensitive 2 (BIN2) acts as a downstream effector of the Target of Rapamycin (TOR) signaling pathway to regulate photoautotrophic growth in Arabidopsis, New Phytol. 213 (2017) 233–249.
[41] Y. Zhang, Y. Zhang, H.E. McFarlane, T. Obata, A.S. Richter, M. Lohse, B. Grimm, S. Persson, A.R. Fernie, P. Giavalisco, Inhibition of TOR represses nutrient consumption, which improves greening after extended periods of etiolation, Plant Physiol. 178 (2018) 101–117.
[42] C. Dong, L. Shao, G. Liu, M. Wang, H. Liu, B. Xie, B. Li, Y. Fu, H. Liu, Photosynthetic characteristics, antioxidant capacity and biomass yield of wheat exposed to intermittent light irradiation with millisecond-scale periods, J. Plant Physiol. 184 (2015) 28–36.
[43] L. Li, Y. Song, K. Wang, P. Dong, X. Zhang, F. Li, Z. Li, M. Ren, TOR-inhibitor insensitive-1 (TRIN1) regulates cotyledons greening in *Arabidopsis*, Front. Plant Sci. 6 (2015) 861.
[44] P. Winge, T. Brembu, A.M. Bones, Cloning and characterization of rac-like cDNAs from *Arabidopsis thaliana*, Plant Mol. Biol. 35 (1997) 483–495.
[45] H. Li, G. Wu, D. Ware, K.R. Davis, Z. Yang, *Arabidopsis* Rho-related GTPases: Differential gene expression in pollen and polar localization in fission yeast, Plant Physiol. 118 (1998) 407–417.
[46] Z.-L. Zheng, Z. Yang, The Rop GTPase: an emerging signaling switch in plants, Plant Mol. Biol. 44 (2000) 1–9.
[47] A.J. Molendijk, F. Bischoff, C.S.V. Rajendrakumar, J. Friml, M. Braun, S. Gilroy, K. Palme, *Arabidopsis thaliana* Rop GTPases are localized to tips of root hairs and control polar growth, EMBO J. 20 (2001) 2779–2788.
[48] R.G. Anthony, R. Henriques, A. Helfer, T. Meszaros, G. Rios, C. Testerink, T. Munnik, M. Deak, C. Koncz, L. Bogre, A protein kinase target of a PDK1 signalling pathway is involved in root hair growth in *Arabidopsis*, EMBO J. 23 (2004) 572–581.
[49] L. Bögre, R. Henriques, Z. Magyar, TOR tour to auxin, EMBO J. 32 (2013) 1069–1071.



Supplementary Fig. 1. Effect of *A. brasilense* inoculation on *A. thaliana* shoots. **a**. Comparison of foliage in non-inoculated and inoculated seedlings. **b-d**. Foliage growth parameters. N = 10. **e-g**. Chlorophyll content. N = 3. Plants were inoculated with 10^3 CFU/ml *A. brasilense*. The asterisk indicates the first true leaf analyzed. Scale bar = 1 mm. Letters on the bars indicate significant difference (*Student's t test; P<0.05*).



Supplementary Fig. 2. *TOR:GUS* expression and cell division during the formation of lateral root primordia. **a, b**. Stages of lateral root primordia and total lateral root primordia (n = 15). **c, d**. *TOR:GUS* and *CYCB1:GUS* expression in lateral root primordia. Plants were inoculated with 10^3 CFU/ml *A. brasilense*. Experiments were repeated three times with similar results. Ab=*A. brasilense*. N = 15. Scale bar = 50 μm. Letters on the bars indicate significant differences (*Tukey's HSD test; P<0.05*).

12.2 Capítulo 2

Phytostimulation and root architecture reconfiguration by *Azospirillum brasilense* Sp245 in *Arabidopsis* on different interaction systems involve elements in the auxin and ethylene signaling pathways

Authors: Manuel Méndez-Gómez, Salvador Barrera-Ortiz, Elda Castro-Mercado, José López-Bucio, Ernesto García-Pineda

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, Edif. A1´, Morelia, Michoacán CP 58040, México

Short title (Running head): The complexity of *A. brasilense* phytostimulation

Corresponding author:

Ernesto García-Pineda

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, Edif. A1´, Morelia, Michoacán CP 58040, México.

Email: egpineda@umich.mx

ORCID: 0000-0002-4739-7741

ABSTRACT

- Plant growth promoting rhizobacteria influence host functional and adaptive traits via complex mechanisms that are just started to be clarified. *Azospirillum brasilense* acts as a probiotic bacterium, but detailed information about its molecular mechanisms of phytostimulation is scarce.
- In this report, three interaction systems were stablished to analyze the impact of *A. brasilense* Sp245 in *Arabidopsis*, which include: 1) Direct root contact with bacteria, ii) Chemical communication via placing the bacterial inoculum in the front of the growing root tip, and iii) Plant-bacteria cocultivation into separated sides of divided Petri plates that enables signaling via volatiles.
- *A. brasilense* Sp245 improved shoot and root biomass production and promoted lateral root initiation and maturation in all three different interaction systems assayed. Cell division, quiescent center and differentiation gene markers *pCYCB1;1::GUS*, *WOX5::GFP*, *pAtEXP7::GUS* and *DR5::GUS* indicated that direct root contact with *A. brasilense* represses primary root growth interfering with cell division and promoting differentiation of epidermal cells into root hairs, and enhanced auxin responsiveness, whereas in divided Petri plates the bacterium promoted lateral root development without repressing primary root growth. Auxin and ethylene signaling elements synergistically orchestrate root developmental responses to bacterization, as indicated by comparison of growth in WT and auxin-related mutants *pin3*, *slr1*, *arf7arf19* and *tir1afb2afb3* and ethylene-related mutants *etr1*, *ein2* and *ein3*.
- Our data highlight the diverse effects by which *A. brasilense* Sp245 improves plant growth and root architectural traits.

Keywords: *Azospirillum brasilense, Arabidopsis thaliana*, auxin, ethylene, plant growth, root architecture.

INTRODUCTION

The plant microbiome supports growth, development and adaptation and many bacterial species are integral to host functioning via production of phytohormones, nitrogen fixation, solubilization of phosphate, and induction of defense (Lugtenberg & Kamilova 2009; Vacheron et al. 2013). A very few bacterial species that promote plant growth have been characterized in detail, some release auxin and other phytohormones or produce volatile organic compounds (VOCs), which target basic physiological programs such as photosynthesis or cell division and/or elongation (Ryu et al. 2003, 2004; Kanchiswamy et al. 2015). The molecular mechanisms underlying the effects of bacterial diffusible compounds and VOCs in plants are largely unknown and the signaling networks orchestrating these responses are not easy to dissect in crops or horticultural species. This makes model plants such as Arabidopsis very valuable in order to descipher the molecular dialogue stablished (Ryu et al. 2003; Zhang et al. 2007; Pérez-Flores et al. 2017; Tahir et al. 2017).

The genus *Azospirillum* has been typified as a plant growth promoting rhizobacterium (PGPR), which colonizes roots and enhances biomass production in several plant species (Cassan & Diaz-Zorita 2016). The role of auxins and other phytoregulators produced by *Azospirillum* in improving plant growth has been demonstrated (Cassan et al. 2014; Strzelczyk et al. 1994; Bottini et al. 1989, 2004; Cohen et al. 2008), but whether VOCs, ethylene, quorum-sensing signals and/or secondary metabolites emitted by this bacterium could also modulate plant growth remains unknown.

Morphological changes induced by *Azospirillum* include increased lateral root growth, root hair formation, as well as a reduction in the main root length. These changes have been mostly related to the production of auxins (Dobbelaere et al. 1999; Spaepen et al. 2008, 2014).

Noteworthy, the expression of ethylene-responsive genes (*ETR2, ERF11, ERF15, ERF59* and *EBF2*) as induced by *Azospirillum brasilense* Sp245 has been reported, indicating that the signaling coordinated by auxin, ethylene, or both may orchestrate the plant morphological reconfiguration during the interaction (Spaepen et al. 2014). However, developmental, genetic and molecular evidences to answer this question remain to be gathered.

The configuration of the root system is controlled by cell division, elongation and differentiation (Petricka et al. 2012). Meristem activity is largely controlled by a group of initial cells and the quiescent center (QC), which instructs the undifferentiated status (Aichinger et al. 2012). Studies on plant growth and root morphology promoted by *A. brasilense* have mostly been performed under conditions in which the bacteria directly colonize the plant root. However, the contribution of diffusible or volatile bacterial compounds to plant growth and changes in root morphology has not been clearly determined. The aim of this research was to fill some of these gaps through the analysis of different types of interaction systems between *A. thaliana* and *A. brasilense* Sp245 including direct contact of roots with the rhizobacteria, plant exposure to bacterial diffusible compounds, and cocultivation of bacteria and plants in opposite sides of divided Petri plates. Our data unravel the complex mechanisms by which *A. brasilense* reconfigurates root system architecture and the phytohormone networks involved in phytostimulation, which synergistically involve components in the auxin-ethylene signaling pathways.

MATERIALS AND METHODS

Arabidopsis growth and bacterial cultivation

The following plant materials were used in this work: *Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0 (WT), the *Arabidopsis* transgenic lines *pCYCB1;1::GUS*, which allows visualization of cells in the G2-M transition phase of the cell cycle (Colón-Carmona et al. 1999); *pAtEXP7::GUS*, which is expressed during root hair initiation and elongation (Cho & Cosgrove 2002); *DR5::GUS*, which is carrying a synthetic auxin-responsive promoter (AuxRE) fused to the enzyme β-glucuronidase and is highly sensitive to auxins (Ulmasov et al. 1997), and *WOX5::GFP, WUSCHEL-RELATED HOMEOBOX 5* (*WOX5)* is a transcription factor required for the maintenance of stem cells and is specifically expressed in the quiescent center (QC) (Blilou et al. 2005; Sarkar et al. 2007); the auxin mutant lines *pin3*, a regulator of auxin efflux (Friml et al. 2002); *slr1*, the *solitary root1* (*slr1*) mutant has a gain-of-function mutation in IAA14, a repressor of auxin signaling that results in development of a primary root without lateral roots (Fukaki et al. 2002); *arf7arf19*, this double mutant is defective in two critical auxin response factors (ARFs), which regulate expression of auxin-responsive genes directly involved in lateral root formation (Okushima et al. 2005, 2007); *tir1afb2afb3*, a triple auxin receptor mutant, encoded by the TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEINS (TIR1/AFBs) (Dharmasiri et al. 2005); and also the ethylene mutants lines *etr1-1*, impaired in the ethylene perception, which is mediated by the protein ETHYLENE RESPONSE 1 (ETR1) (Hua and Meyerowitz 1998); *ein2-1*, the loss of ETHYLENE INSENSTIVE 2 (EIN2) confers insensitivity to both exogenous and endogenous ethylene (Guzmán & Ecker 1990), and *ein3-1*, a mutant of

ETHYLENE INSENSTIVE 3 (EIN3), which is a transcription factor that activates ethylene-induced transcription (Chao et al. 1997).

Seeds were disinfected with 95% (vol/vol) ethanol for 5 min, and 20% (vol/vol) bleach (Cloralex) for 5 min, followed by five washes with sterile distilled water. The seeds were stored at 4 °C for 2 days prior to sowing. The seeds were germinated and grown on agar plates containing 0.2X Murashige and Skoog (MS) medium, pH 7 (Murashige & Skoog 1962) with 0.9 g/L MS salt, 6 g/L sucrose and 10 g/L Agar Plant TC (PhytoTechnology Laboratories, St, Lenexa, KS, USA). Plants were placed vertically in a plant growth chamber (Percival Scientific AR-95L) at 22 °C with a photoperiod of 16 h light (light intensity of 100 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$) and 8 h darkness.

Wild-type *Azospirillum brasilense Sp245* used in this study was kindly donated by Dr. Gladys Alexandre (University of Tennessee, USA). Bacteria were grown in LB medium, pH 7 (10 g/L peptone, 5 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl, supplemented with 0.30 g/L $MgSO_4$ and 0.277 g/L $CaCl_2$; for solidified medium, 15 g/L agar was added). To prepare the inoculum, the bacteria were treated according to Spaepen et al. (2014). Cultures were grown 20 h (exponential phase) at 27 °C with rotation at 100 rpm. The cultures were then washed twice in 0.9% NaCl by centrifugation (4300 x g, 10 min, 4°C), resuspended in 0.01 M $MgSO_4$, and adjusted by sequential dilutions to a desired final concentration of colony-forming units (CFU) for use as inoculum.

Seedling inoculation

Four days after germination, seedlings were aseptically transferred to Petri dishes containing 0.2X Murashige and Skoog (MS) medium, pH 7. First, different bacterial concentrations

(10^3, 10^4, 10^5, and 10^6 CFU per mL) were analyzed to establish the best concentration that improves growth. Bacteria were mixed with the medium and allowed to solidify. For direct contact treatment, the bacteria were distributed all over the plate by mixing at the appropriate concentration to 30 mL of plant medium. For diffusible compounds produced by the bacteria, droplets of a bacterial culture (10^3 CFU per mL) were placed 5 cm from the plant. For volatile compounds treatment, droplets of a bacterial culture (10^3 CFU per mL) were placed on 0.2X MS medium on the left side of Petri dishes with one division. For all treatment, the Petri dishes were sealed with a plastic wrap and incubated vertically into a plant growth chamber.

Analysis of plant growth

For all experiments, plant growth parameters were analyzed six days after inoculation. The fresh weight per plant was determined with an analytical balance (Ohaus V14130 Voyager). Primary root growth was measured using a ruler. The number of lateral roots was determined using a stereoscopic microscope (Leica MZ6) to count the lateral roots present in the primary root from the tip to the root/stem transition zone. Lateral root density (LRD) was obtained by dividing the number of lateral roots by the length of the primary root and is expressed as LR number/cm. Emerged lateral roots was monitored with an Eclipse E200LED MV R microscope (Nikon Corp., Tokyo, Japan) each day post-inoculation in WT seedlings clarified according to Malamy & Benfey (1997). Root hairs were analyzed using a stereoscopic microscope and the number of root hairs within 1 mm of the root were counted starting from the first radical hair above the root tip. To analyze the primary root meristem, the root was clarified (Malamy & Benfey 1997) and analyzed using a Leica DFC450C microscope

(Nomarski Optics). The meristem length was defined as the distance between the quiescent center (QC) and the first cell of the cortex that was elongated. Digital images obtained from the roots were analyzed for meristem length and root hair formation with ImageJ software (https://imagej.nih.gov/ij/).

Cell division was analyzed with the cell cycle marker *pCYCB1;1::GUS*, cell differentiation with the expansin marker *pAtEXP7::GUS*, and meristem organization with the transcription factor *WOX5::GFP*. Responses to auxin were evaluated using *DR5::GUS* transgenic seedlings. For positive control in *DR5::GUS* experiments, seedlings were incubated during 10 hours into liquid MS medium with 0.05 μM of indole-3-acetic acid (IAA).

Histochemical and fluorescence analysis

Transgenic lines expressing the *uidA* reporter gene (GUS: β-glucuronidase) were stained with 0.1% X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl ß-D-glucuronide) dissolved in phosphate buffer (NaH_2PO_4 and Na_2HPO_4, 0.1 M, pH 7), 2 mM potassium ferrocyanide and 2 mM potassium ferricyanide overnight at 37 °C, except for *pAtEXP7::GUS*, which was stained for 20 minutes. Plants were cleared and fixed as previously described (Malamy & Benfey 1997). The processed plants were mounted on glass slips and sealed with commercial nail varnish. Subsequently, the slides were observed and photographed using a Leica DFC450C microscope. To determine the fluorescence in the transgenic line *WOX5::GFP*, plants were treated with a 10 mg/mL propidium iodide solution to visualize the cell contour and subsequently analyzed using an Olympus FV1000 confocal microscope (Olympus Corp., Tokyo, Japan). Propidium iodide fluorescence was visualized using an argon laser at 568 nm for excitation and an emission window of 585-610 nm, whereas GFP fluorescence was

visualized with excitation and emission wavelengths of 488 nm and 505-550 nm, respectively. All reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) unless otherwise noted.

Statistical analysis

All experiments were repeated at least three times. The data were analyzed using the STATISTICA program version 8.0.550. Univariate and multivariate analyses followed by a *post-hoc* test (Tukey's HSD) were used to examine differences between experimental groups. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

RESULTS

Effect of *A. brasilense* on *A. thaliana* growth

The effect of *A. brasilense* on *A. thaliana* was first analyzed by transferring 4-day-old *A. thaliana* seedlings to agar solidified 0.2X MS medium with spread bacterial colonies at different density, and the effect on plant growth was determined 6 days later. The rhizobacterium decreased primary root length according to the number of colonies already present (Figure S1a). A conspicuous increase in both lateral root number and fresh weight at all rhizobacterial inoculum density (Figure S1b,c) shows the correlation between root branching and biomass production. On the basis of these results, a concentration of 10^3 CFU per mL of *A. brasilense* was used for all subsequent experiments.

Effect of different types of *Arabidopsis*-*A. brasilense* interaction on plant biomass and root architecture

Differential effects of *A. brasilense* on plant growth were observed for the three different types of interactions with *Arabidopsis*. In all three conditions *A. brasilense* increased shoot and root fresh weight, whereas in the divided Petri plates the volatiles emitted by the bacterium had the most conspicuous effects on root growth and biomass production (Fig. 1a-d). In contrast, *A. thaliana* in direct contact with the bacteria had increased lateral root number and density, which was also observed when the roots grow towards a concentrated bacterial inoculum (Fig. 1e, f). A time course analysis indicated that promotion of root branching started by 3 d after bacterial contact and the number of newly emerged lateral roots progressively increased until the end of the experiment (Fig. 1g).

The promoting or repressing effects of the rhizobacteria on *A. thaliana*, specifically on primary roots, were tightly linked to cell division, since seedling exposure to the volatiles increased ~40% meristem length when compared to controls, whereas roots in direct contact or in presence of diffusible compounds manifested roughly ~35% and ~25% reduction in meristem size, respectively (Figure 2a,b).

To further analyze cellular changes on primary roots, we next compared the effect of *A. brasilense* on root hairs. The effect of the rhizobacteria on the number of root hairs and root hair length was variable, with direct contact and diffusible compounds treatments showing higher increases in these traits, compared with plants in divided Petri plates. In addition, the formation of root hairs occurred closer to the root tip in the direct contact interaction, suggesting that the rhizobacteria stimulated cell differentiation near the meristem (Fig. S2a-c).

These data show that although *A. brasilense* behaves as a plant growth promoting bacterium in different interaction systems, there are subtle differences in the root architectural responses manifested, which suggest different mechanisms of phytostimulation.

Effect of *A. brasilens*e on meristem activity

To analyze the molecular mechanisms by which the rhizobacteria differentially stimulated changes in root length and differentiation, we focused on cell division, quiescent center identity and cell differentiation in the primary root meristem. Using *A. thaliana* plants transformed with cyclin-GUS (*pCYCB1;1::GUS*), we analyzed patterns of mitotic activity in response to the different interaction types. Interestingly, 6 d after treatment the area of reporter expression was reduced in plants in direct contact, and with diffusible compounds, whereas with volatile compounds perceived in the divided Petri plates exhibited increased expression and intensity, relative to axenic controls (Fig. 3a). These results show that the rhizobacteria may affect differentially meristem cell division depending upon the mechanism of interaction. Using *WOX5::GFP* transgenic plants to visualize QC structure, low levels of WOX5 expression were observed in direct contact, whereas with diffusible and volatile compounds transgenic plants showed a sustained GFP fluorescence intensity (Fig. 3b). In relation to cell differentiation, wild-type *A. thaliana* plants harboring the *AtEXP7* promoter::GUS (*pAtEXP7*::*GUS*), and in direct contact with rhizobacteria showed a sharp increase in expression, which was closer to the root tip. Similar increase of marker expression was observed with diffusible compounds. These increases were higher than that seen for the volatile compounds in divided Petri plates (Fig. 3c). The results show that the rhizobacteria can stimulate plant tissue differentiation in several ways, and that

changes in root morphology by *A. brasilense* result from different molecular responses stimulated by specific interactions within the root tips.

Effect of *A. brasilense* on auxin-regulated gene expression in primary roots

We further analyzed the role of some phytoregulators potentially involved in the plant-bacterium, namely auxin and ethylene. First, to determine if the observed contrasting effects of the interaction type on *A. thaliana* could also depend on the auxin-signaling pathway, we analyzed the expression of the auxin-inducible marker *DR5*::*GUS* in *A. thaliana* seedlings in all three different interaction systems, 6 d after inoculation (Fig. 4). In control plants, auxin expression was located in leaf edges and lateral roots. The addition of 0.5 µM IAA strongly increased β-glucuronidase expression in shoot and root tissues. In plants from all three interactions, similar *DR5*::*GUS* expression relative to control plants was observed in the shoot. However, in direct contact with roots, β-glucuronidase expression was strongly increased along the root and in lateral roots, whereas with diffusible and volatile compounds, the expression localized only to the lateral roots. Thus, auxin response varies in the root depending on the interaction type.

Role of auxin signaling in the phytostimulation by *A. brasilense*

Subsequent analysis of auxin signaling in plants was performed using the wild-type *A. thaliana* and *pin3, slr1, arf7arf19* and *tir1afb2afb3* mutants. Primary root length for the all mutants were similar to wild-type seedlings for all interaction types, suggesting that PIN3, SLR1, ARF7, ARF19, TIR1, AFB2 and AFB3 proteins are not needed for primary root

elongation regardless of the presence of rhizobacteria (Fig. 5a,c,e). No lateral root formation was seen for the *arf7arf19, slr1* and *tir1afb2afb3* mutants in any interaction type, also suggesting that these transcription factors, represors and receptors are required for promotion of branching by the rhizobacterium and its metabolites (Fig. 5b,d,f).

On the other hand, the three interaction types with wild-type *A. thaliana* clearly promoted both root hair number and length, but interestingly, these effects were absent in most auxin-related mutants tested (Figure S3), which indicated the importance of the auxin signaling pathway for this response, regardless of the kind of interaction established.

Role of ethylene signaling in phytostimulation by *A. brasilense*

The role of ethylene in promoting plant growth in the three different interaction types with *A. brasilense* was evaluated in WT, *etr1*, *ein2* and *ein3 Arabidopsis* mutants. On day 6 after treatment, the general phenotype of all mutant plants was similar to the WT. All mutant plants showed similar primary root growth and lateral root number to the wild-type, regardless of interaction system (Fig. 6). However, when considering root hair formation, only *ein2* mutant had decreased root hair number and length for all interaction types (Figure S4). These data suggest that ethylene signaling via EIN2 modulates root hair development as a response to *A. brasilense.*

DISCUSSION

Most previous analyses of plant growth promotion by *A. brasilense* have been performed under conditions that involve direct contact between the rhizobacteria and plant roots

(Dobbelaere et al. 1999; Spaepen et al. 2008; 2014). Thus, the effect of diffusible and volatile compounds produced by *A. brasilense* Sp245 on plant growth remained unclear. Here we observed that this rhizobacterium can promote plant growth in three different co-cultivation systems in which direct contact and/or contact with diffusible or volatile compounds are established. Interestingly, the different interaction types had varying effects on plant growth, such that plants exposed to volatile compounds produced by rhizobacteria had a larger increase in biomass and root length, relative to the other two interaction types and axenic seedlings. The phenotypic differences in the three conditions indicate that the rhizobacterium can emit various types of molecules that differentially regulate plant growth, perhaps changing the endogenous levels of phytohormones.

The phenotype observed in direct contact was similar to that previously reported in wheat and *Arabidopsis* plants inoculated with *A. brasilense*, and with the exogenous addition of IAA (Dobbelaere et al. 1999; Spaepen et al. 2008; 2014). It has been reported that auxins and other molecules produced by *Azospirillum* such as cytokinins, gibberellins, acetic acid and nitric oxide play important role during this type of interaction (Bashan & de-Bashan 2010). Nevertheless, rhizobacteria can produce other biochemical compounds with ability to impact plant growth, such as volatile organic compounds or ethylene, which may have an effect on plant growth and in the formation of lateral roots and root hairs (Niu et al. 2011; Kai & Piechulla 2009; Ryu et al. 2003; Masle 2000). We found that volatile compounds produced by *A. brasilense* Sp245 increased shoot and root fresh weight as well as primary root length, but the chemical nature of the volatiles emitted by this rhizobacterium remains to be determined.

The analysis of cell division in the root tip using the reporter *pCyCB1,1::GUS* showed that the expression of this cell division marker was higher for plants exposed to volatile

compounds, relative to those in the direct contact or in the vicinity of the inoculum. This expression correlated with increased root length. Previous reports evidenced that rhizobacteria of the genus *Pseudomonas* and *Bacillus* induce changes in cell division and differentiation, which alter root architecture in the host plant (López-Bucio et al. 2007; Zamioudis et al. 2013). Thus, the differences in root growth, under different interaction types, could be due to the changes in cell division stimulated by the rhizobacterium. Accordingly, *WOX5::GFP* expression was reduced in the direct contact group, whereas in the diffusible and volatile compound groups, it was slightly increased relative to WT plants. The WOX5 transcription factor is expressed only in the QC and controls the identity of stem cells that give rise to all meristem cell types (Sarkar et al. 2007; Aichinger et al. 2012). WOX5 loss-of-function causes terminal differentiation in distal stem cells and abates cell division in the meristem, indicating the importance of these cells in maintaining meristem organization and function (Sarkar et al. 2007; Forzani et al. 2014). The high degree of root differentiation stimulated by direct contact of roots to *A. brasilense* Sp245 likely resulted from the decreased expression of this marker. The changes in root differentiation were supported by *pAtEXP7::GUS* expression levels, which were higher in the direct contact group but lower in the volatile compound group.

We also tested the response of the auxin-inducible marker *DR5*::*GUS* to examine effects of rhizobacteria on auxin signaling pathways. This marker was highly expressed along the root in direct contact with bacteria, whereas with diffusible and volatile compounds high expression of this marker was observed only in leaf edges and lateral roots as in the control condition. Hormonal redistribution was previously shown to alter cell division and differentiation patterns (Blilou et al. 2005; Dello Ioio et al. 2007, 2008). These results suggest

that the auxin redistribution mediated by the type of interaction contributes to the root architectural reconfiguration in *Arabidopsis*.

The auxin transporter PIN3 appeared not to be required to stimulate changes in root morphology in the three interaction systems, whereas the repressor SLR1, the receptors TIR1/AFB2/AFB3 and the transcription factors ARF7/ARF19 were necessary for lateral root formation and root hair development promoted by the bacterium in all interaction groups. Changes in the root system architecture indicate that the *A. brasilense* tightly influences the endogenous processes that control root development. Indeed, auxins play a critical role in the initiation and elongation of lateral roots, thus promoting root branching, a critical trait for nutrient and water uptake (Fukaki et al. 2007; Dubrovsky et al. 2008).

Exposure to *A. brasilense*, either through direct contact or via its diffusible or volatile compounds, induced basically no changes in root growth of plants having mutations in ethylene-mediated signaling pathways, but a decreased in length and number of root hairs was observed in *ein2* among the different interaction types, suggesting that ethylene signaling mainly contributes to root-hair elongation and formation processes during the plant-bacteria interactions. This result is in agreement with two previous reports that showed a contribution of ethylene to the elongation of root hairs in tomato and *Arabidopsis* induced by *Azospirillum* and *Pseudomonas*, respectively (Ribaudo et al. 2006; Zamioudis et al. 2013). Finally, the effect of bacterial contact or secondary metabolites on plant growth seems to be due to a mixture of effects caused either by elicitors, diffusible compounds and/or volatiles.

Together our results showed that the effects of *A. brasilense* Sp245 on *Arabidopsis* is complex and involves elements in the auxin and ethylene pathways, which synergistically control different processes such as cell division and differentiation, underpinning their complimentary roles in plant growth and development during a probiotic interaction.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Coordinación de la Investigación Científica, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México. We thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the postgraduate scholarship to MMG (276783). We also sincerely thank León Francisco Ruiz-Herrera for technical assistance for confocal microscopy.

AUTHOR CONTRIBUTION STATEMENT

MMG and EGP designed the experiments. MMG and SBO conducted the experiments. JLB and ECM provided materials, reagents and technical support. MMG, EGP and JLB analyzed the data and wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

Aichinger E., Kornet N., Friedrich T., Laux T. (2012) Plant stem cell niches. *Annual Review of Plant Biology*, **63**, 615-636.

Bashan Y., de-Bashan L.E. (2010) How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth - a critical assessment. *Advances in Agronomy*, **108**, 77-136.

Blilou I., Xu J., Wildwater M., Willemsen V., Paponov I., Friml J., Heidstra R., Aida M., Palme K., Scheres B. (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature*, **433**, 39-44.

Bottini R., Cassán F., Piccoli P. (2004) Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **65**, 497-503.

Bottini R., Fulchieri M., Pearce D., Pharis R.P. (1989) Identification of gibberellins A(1), A(3), and iso-A(3) in cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiology*, **90**, 45-47.

Cassan F., Diaz-Zorita M. (2016) *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. *Soil Biology and Biochemistry*, **103**, 117-130.

Cassan F., Vanderleyden J., Spaepen S. (2014) Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, **33**, 440-459.

Chao Q., Rothenberg M., Solano R., Roman G., Terzaghi W., Ecker J.R. (1997) Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell*, **89**, 1133-1144.

Cho H.T., Cosgrove D.J. (2002) Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **14**, 3237-3253.

Cohen A.C., Bottini R., Piccoli P.N. (2008) *Azospirillum brasilense* Sp245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in *Arabidopsis* plants. *Plant Growth Regulation*, **54**, 97-103.

Colón-Carmona A., You R., Haimovitch-Gal T., Doerner P. (1999) Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. Plant J 20: 503-508

Dello Ioio R., Linhares F.S., Scacchi E., Casamitjana-Martinez E., Heidstra R., Costantino P., Sabatini S. (2007) Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. *Current Biology*, **17**, 678-682.

Dello Ioio R., Nakamura K., Moubayindin L., Perilli S., Taniguchi M., Morita M.T., Aoyama T., Costantino P., Sabatini S. (2008) A genetic framework for genetic control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science*, **322**, 1380-1384.

Dharmasiri N., Dharmasiri S., Weijers D., Lechner E., Yamada M., Hobbie L., Ehrismann J.S., Jürgens G., Estelle M. (2005) Plant development is regulated by a family of auxin receptor F Box proteins. *Developmental Cell*, **9**, 109-119.

Dobbelaere S., Croonenborghs A., Thys A., Broek A.V., Vanderleyden J. (1999). Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil*, **212**, 155-164.

Dubrovsky J.G., Sauer M., Napsucialy-Mendivil S., Ivanchenko M.G., Friml J., Shishkova S., Celenza J., Benková E. (2008) Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 8790-8794.

Forzani C., Aichinger E., Sornay E., Willemsen V., Laux T., Dewitte W., Murray J.A.H. (2014) WOX5 suppresses *CYCLIN D* activity to establish quiescence at the center of the root stem cell niche. *Current Biology*, **24**, 1939-1944.

Friml J., Wisniewska J., Benková E., Mendgen K., Palme K. (2002) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature*, **415**, 806-809.

Fukaki H., Okushima Y., Tasaka M. (2007) Auxin-mediated lateral root formation in higher plants. *International Review of Cytology*, **256**, 111-137.

Fukaki H., Tameda S., Masuda H., Tasaka M. (2002) Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **29**, 153-168.

Guzmán P., Ecker J.R. (1990) Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell*, **2**, 513-523.

Hua J., Meyerowitz E.M. (1998) Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, **94**, 261-271.

Kai M., Piechulla B. (2009) Plant growth promotion due to rhizobacterial volatiles - An effect of CO_2?. *FEBS Letters*, **583**, 3473-3477.

Kanchiswamy C.N., Malnoy M., Maffei M.E. (2015) Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Frontiers in Plant Science*, **6**, 151.

López-Bucio J., Campos-Cuevas J.C., Hernández-Calderón E., Velásquez-Becerra C., Farías-Rodríguez R., Macías-Rodríguez L.I., Valencia-Cantero E. (2007) *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin- and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **20**, 207-217.

Lugtenberg B., Kamilova F. (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, **63**, 541-556.

Malamy J.E., Benfey P.N. (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, **124**,33–44.

Masle J. (2000) The effects of elevated CO_2 concentrations on cell division rates, growth patterns, and blade anatomy in young wheat plants are modulated by factors related to leaf position, vernalization, and genotype. *Plant Physiology*, **122**, 1399-1415.

Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiolgia Plantarum*, **15**, 473-497.

Niu Y., Jin C., Jin G., Zhou Q., Lin X., Tang C., Zhang Y. (2011) Auxin modulates the enhanced development of root hairs in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. under elevated CO_2. *Plant, Cell & Environment*, **34**, 1304-1317.

Okushima Y., Fukaki H., Onoda M., Theologis A., Tasaka M. (2007) ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD / ASL genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **19**, 118-130.

Okushima Y., Overvoorde P.J., Arima K., Alonso J.M., Chan A., Chang C., Ecker J.R., Hughes B., Lui A., Nguyen D., Onodera C., Quach H., Smith A., Yu G., Theologis A. (2005) Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in *Arabidopsis thaliana*: Unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. *Plant Cell*, **17**, 444-463.

Pérez-Flores P., Valencia-Cantero E., Altamirano-Hernández J., Pelagio-Flores R., López-Bucio J., García-Juárez P., Macías-Rodríguez L. (2017) *Bacillus methylotrophicus* M4-96 isolated from maize (*Zea mays*) rhizoplane increases growth and auxin content in *Arabidopsis thaliana* via emission of volatiles. *Protoplasma*, **254**, 2201-2213.

Petricka J.J., Winter C.M., Benfey P.N. (2012) Control of *Arabidopsis* root development. *Annual Review of Plant Biology*, **63**, 563-590.

Ribaudo C.M., Krumpholz E.M., Cassán F.D., Bottini R., Cantore M.L., Curá J.A. (2006) *Azospirillum* sp. Promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. *Journal of Plant Growth Regulation*, **25**, 175-185.

Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Wei H.X., Paré P.W., Kloepper J.W. (2003) Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 4927-4932.

Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Kloepper J.W., Paré P.W. (2004) Bacterial volatiles induced resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **134**, 1017-1026.

Sarkar A.K., Luijten M., Miyashima S., Lenhard M., Hashimoto T., Nakajima K., Scheres B., Heidstra R., Laux T. (2007) Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature*, **446**, 811-814.

Spaepen S., Bossuyt S., Engelen K., Marchal K., Vanderleyden J. (2014) Phenotypical and molecular responses of *Arabidopsis thaliana* roots as a result of inoculation with the auxin-producing bacterium *Azospirillum brasilense. New Phytologist*, **201**, 850-861.

Spaepen S., Dobbelaere S., Croonenborghs A., Vanderleyden J. (2008) Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant and Soil*, **312**, 15-23.

Strzelczyk E., Kampert M., Li C.Y. (1994) Cytokinin-like substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiological Research*, **149**, 55-60.

Tahir H.A.S., Gu Q., Wu H., Raza W., Hanif A., Wu L., Colman M.V., Gao X. (2017) Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. *Frontiers in Microbiology*, **8**, 171.

Ulmasov T., Murfett J., Hagen G., Guilfoyle T.J. (1997) Aux/lAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell*, **9**, 1963-1971.

Vacheron J., Desbrosses G., Bouffaud M.L., Touraine B., Moënne-Loccoz Y., Muller D., Legendre L., Wisniewski F., Prigent-Combaret C. (2013) Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, **4**, 356.

Zamioudis C., Mastranesti P., Dhonukshe P., Blilou I., Pieterse C.M.J. (2013) Unraveling root developmental programs initiated by beneficial *Pseudomonas* spp. Bacteria. *Plant Physiology*, **162**, 304-318.

Zhang H., Kim M.S., Krishnamachari V., Payton P., Sun Y., Grimson M., Farag M.A., Ryu C.M., Allen R., Melo I.S., Paré P.W. (2007) Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta*, **226**, 839-851.

Figures

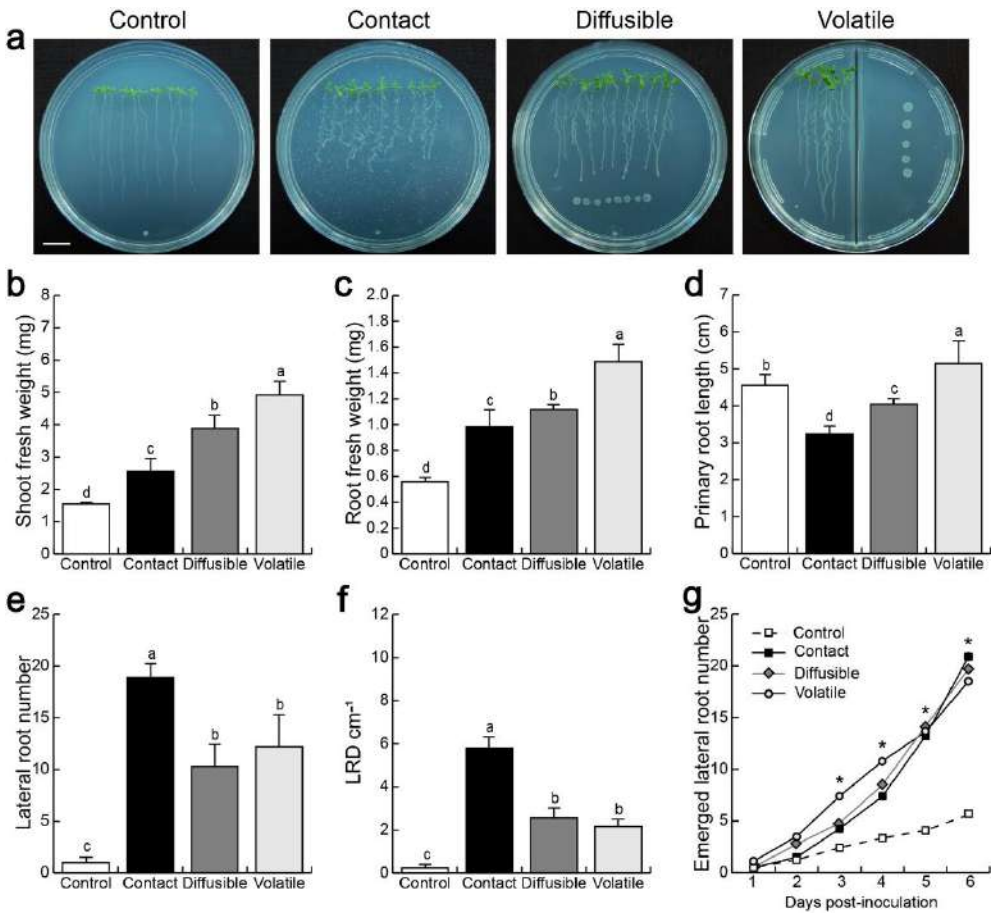


Fig. 1. Effects of *A. brasilense* Sp245 on the growth of *A. thaliana* seedlings under direct contact, diffusible and volatile compounds production. (**a**) Representative images of plants 6 days after inoculation in the different experimental conditions. (**b**) Shoot fresh weight. (**c**) Root fresh weight. (**d)** Primary root length. (**e**) Lateral root number. (**f**) Lateral root density (LRD). (**g**) Kinetics of lateral root formation. The plants were inoculated with 10^3 CFU per milliliter. n=30. Bar in (**a**) = 1 cm. CFU: Colony Forming Units. The experiments were performed three times with similar results. The letters and asterisks on the bars indicate statistically significant differences according to Tukey's HSD test, *P<0.05.*

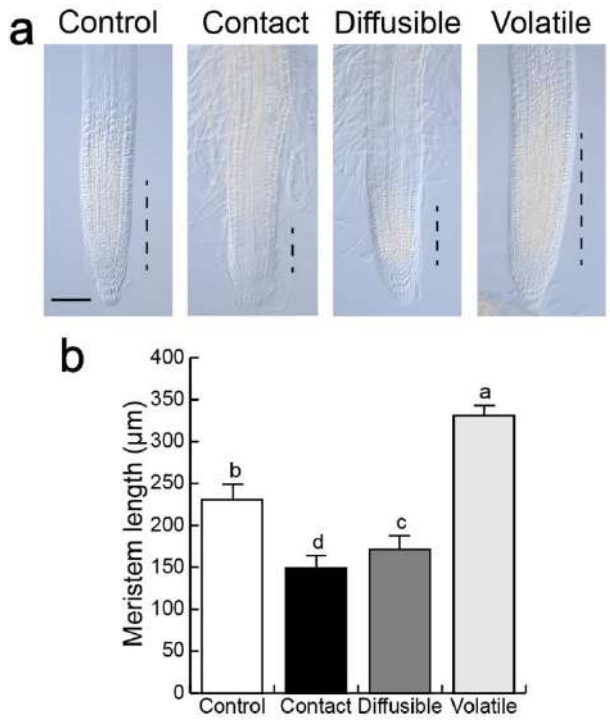


Fig. 2. Effect of *A. brasilense* Sp245 on the length of the primary root meristem under different experimental conditions. (**a**) Representative images of the primary root meristem of seedlings 6 days after bacterial inoculation. The dotted lines indicate the root meristem zone. (**b**) Meristem length, considered as the distance between the quiescent center and the first elongated cell from the cortex, where the cell elongation zone begins. n=30. Plants were inoculated with 10^3 CFU per milliliter. Bar in (a) = 100 µm. The experiments were performed three times similar results. The letters on the bars indicate statistically significant differences according to Tukey's HSD test, $P < 0.05$.

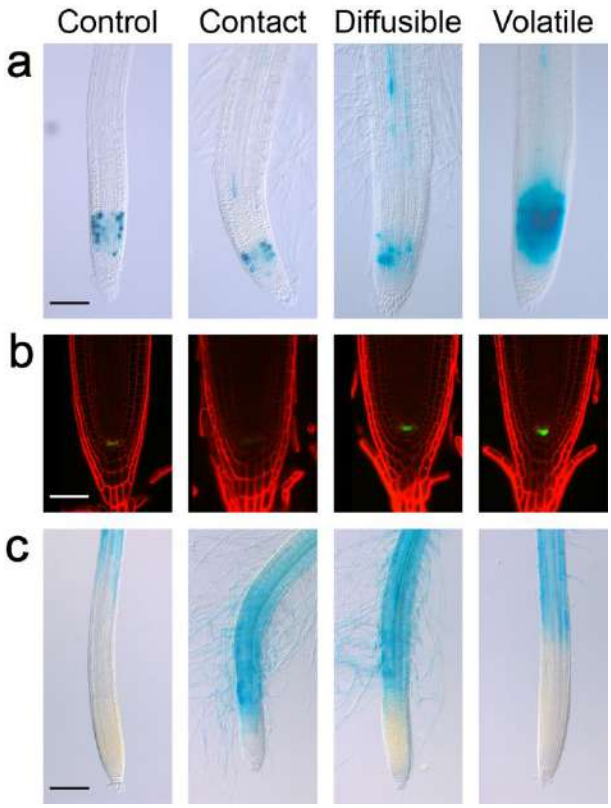


Fig. 3. Effect of *A. brasilense* Sp245 on cell division, quiescent center and differentiation in *Arabidopsis* primary roots. (**a**) Representative images showing expression of the cell division marker *pCYCB1;1::uidA*, (**b**) *WOX5::GFP* and (**c**) *pAtEXP7::GUS*. n=30. The plants were inoculated with 10^3 CFU per milliliter and the expression of the markers was analyzed 6 days post-inoculation. Bars in a, b, c = 100, 50, 200 μm, respectively. The experiments were performed three times with similar results.

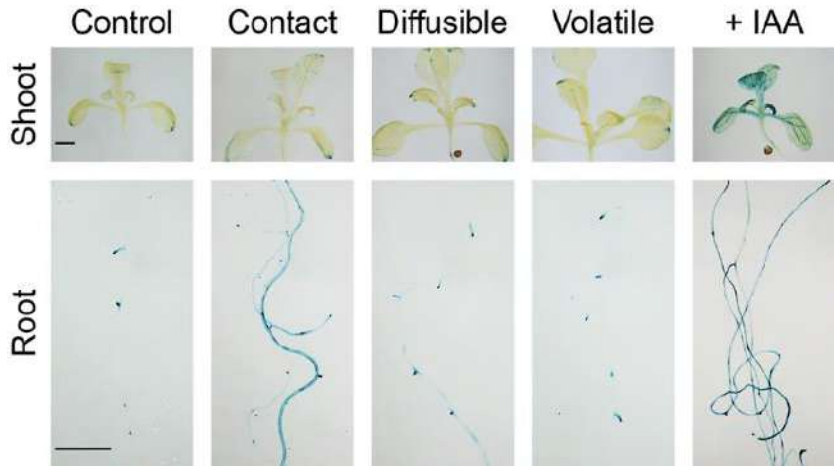


Fig. 4. Effect of *A. brasilense* Sp245 on expression of the auxin response marker *DR5::uidA*. Representative images of the shoot, root and primary root meristem of seedlings after 6 days of interaction with 10^3 CFU per milliliter of *A. brasilense*. As a positive control, plants were treated for 10 h with 0.05 μM of IAA in liquid MS medium. Bars in shoot and root = 1 mm; bar in root meristem = 100 μm. n=30. The experiments were performed least three times with similar results.

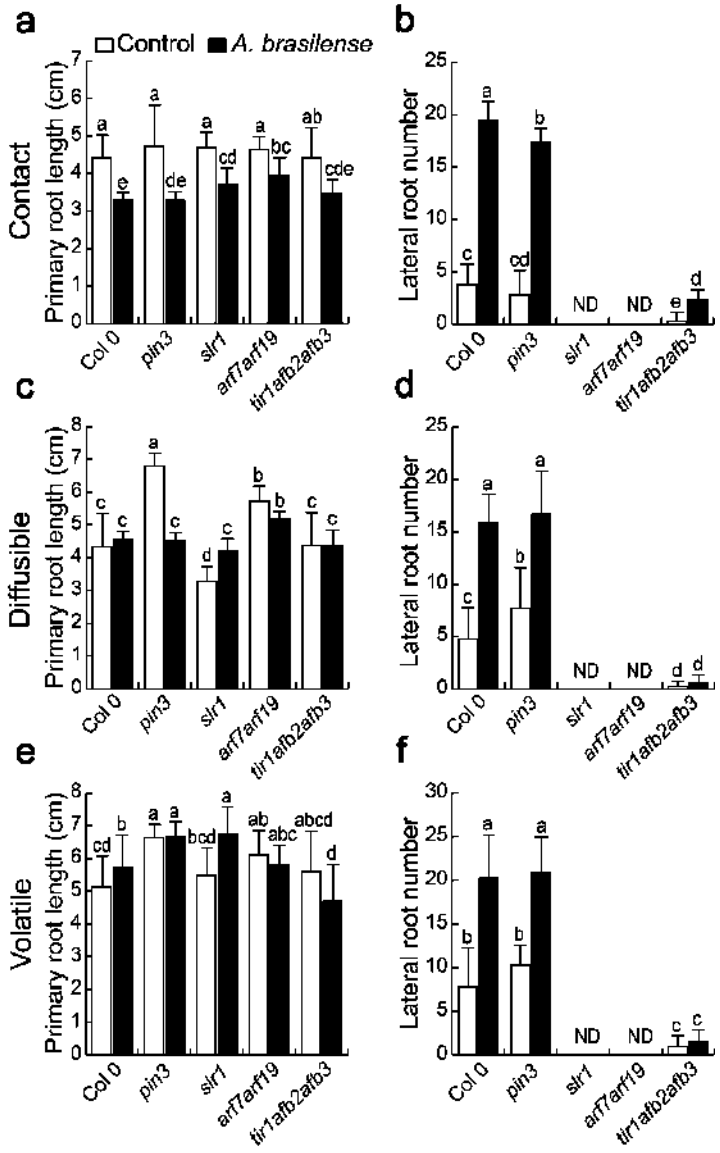


Fig. 5. Effect of *A. brasilense* Sp245 on growth of WT and mutant plants carrying mutations in genes of the auxin signaling pathway. Effects of bacterial inoculation on length of the primary root and lateral root formation in direct contact (**a**, **b**), inoculated in the front of the growing primary root (**c, d**), and in divided Petri plates (**e, f**). The plants were analyzed 6 d after treatment. ND: not determined. n=30. The experiments were performed three times with similar results. The letters on the bars indicate statistically significant differences according to Tukey's HSD test, $P < 0.05$.

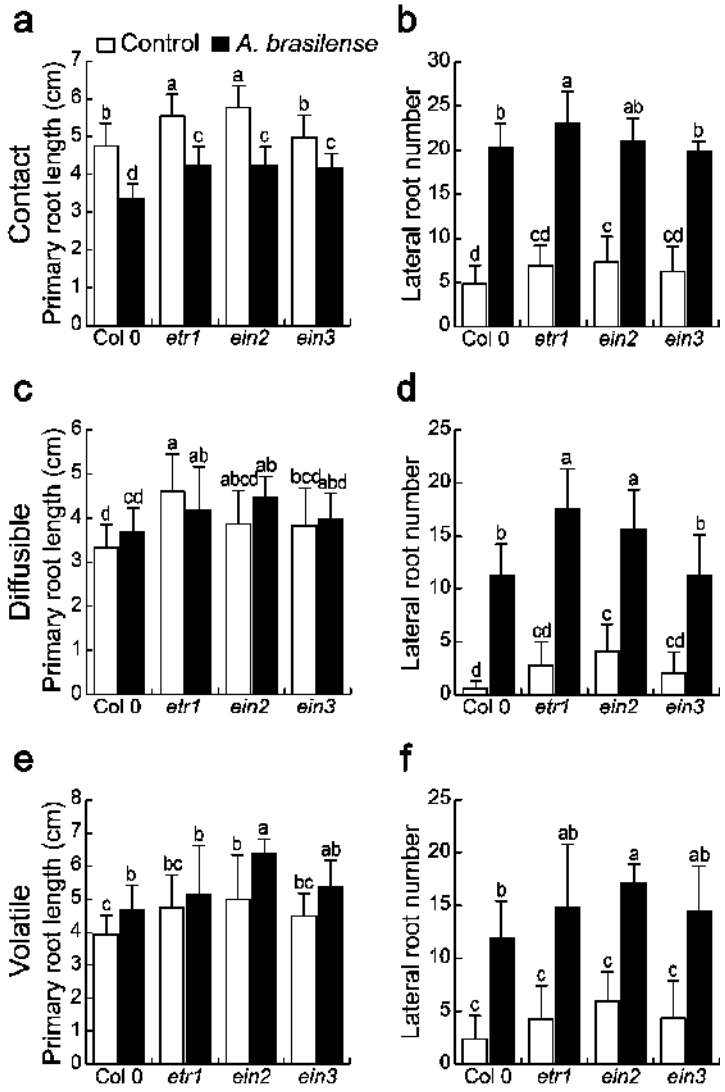


Fig. 6. Effect of *A. brasilense* Sp245 on root growth of WT and mutant plants carrying mutations in genes of the ethylene signaling pathway. Effects of bacterial inoculation on length of the primary root and lateral root formation in direct contact (**a**, **b**), inoculated in the front of the growing primary root (**c, d**), and in divided Petri plates (**e, f**). The plants were analyzed 6 d after treatment. n=30. The experiments were performed three times with similar results. The letters on the bars indicate statistically significant differences according to Tukey's HSD test, $P < 0.05$.

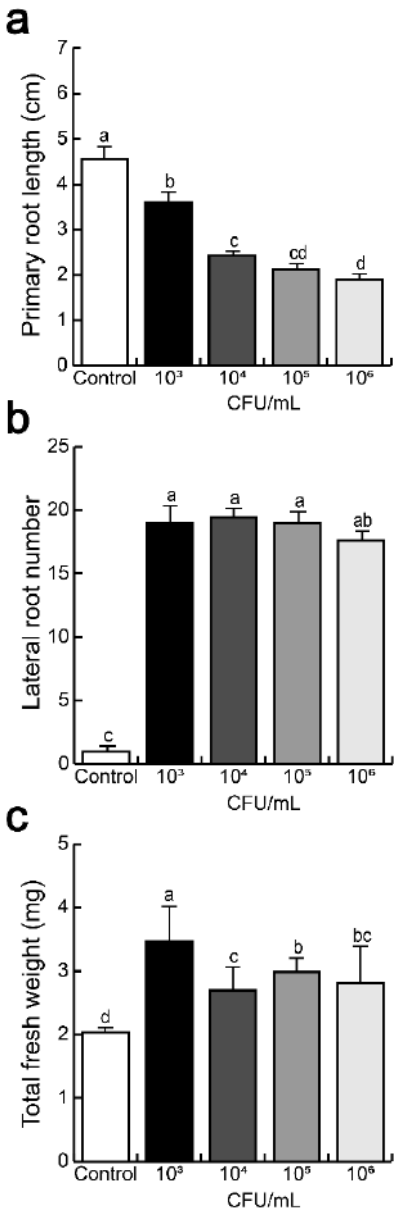


Figure S1. Effects of increasing *A. brasilense* Sp245 inoculum density on growth of *A. thaliana* seedlings. (**a**) Primary root length, (**b**) Lateral root number, (**c**) Total fresh weight. The plants were inoculated with increasing bacterial concentrations, and parameters analyzed 6 days after inoculation. n=30. CFU: Colony Forming Units. The experiments were performed three times with similar results. The letters on the bars indicate statistically significant differences according to Tukey's HSD test, $P<0.05$.

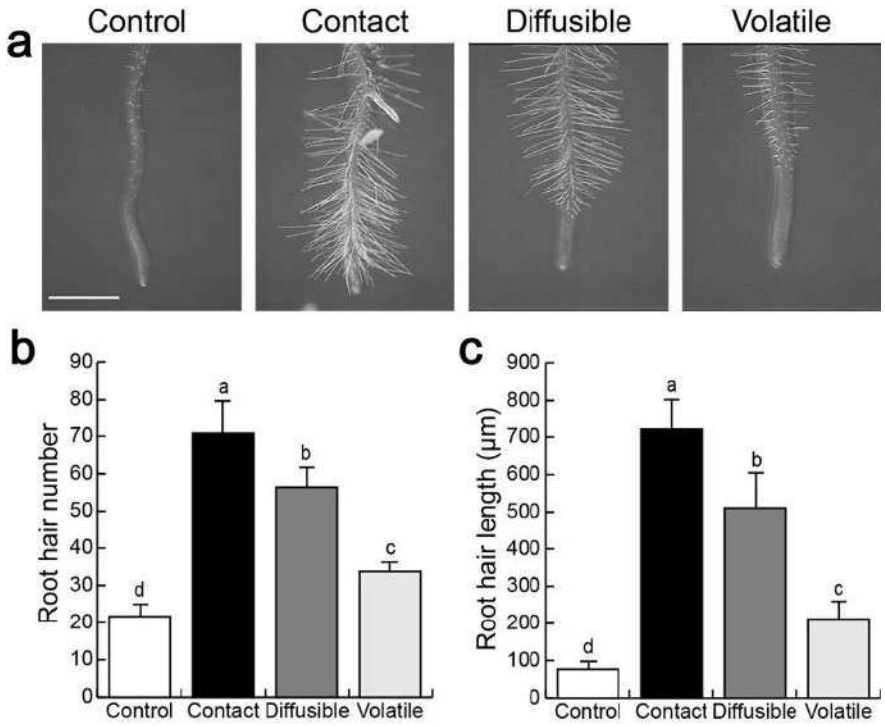


Figure S2. Effect of *A. brasilense* Sp245 on *Arabidopsis* root hair formation under different experimental conditions. (**a**) Representative images of root hairs of seedlings 6 days after interaction with *A. brasilense* via root contact with colonies, diffusible compounds, or volatile compounds. (**b**) Root hair number. **(c**) Root hair length. The number of root hairs was determined in 1 mm segment of the primary root, starting with the first root hair formed. n=30 roots and 300 root hairs. The plants were inoculated with 10^3 CFU per milliter. Bar in (**a**) = 1 mm. The experiments were performed three times with similar results. The letters on the bars indicate statistically significant differences according to Tukey's HSD test, *P <0.05.*

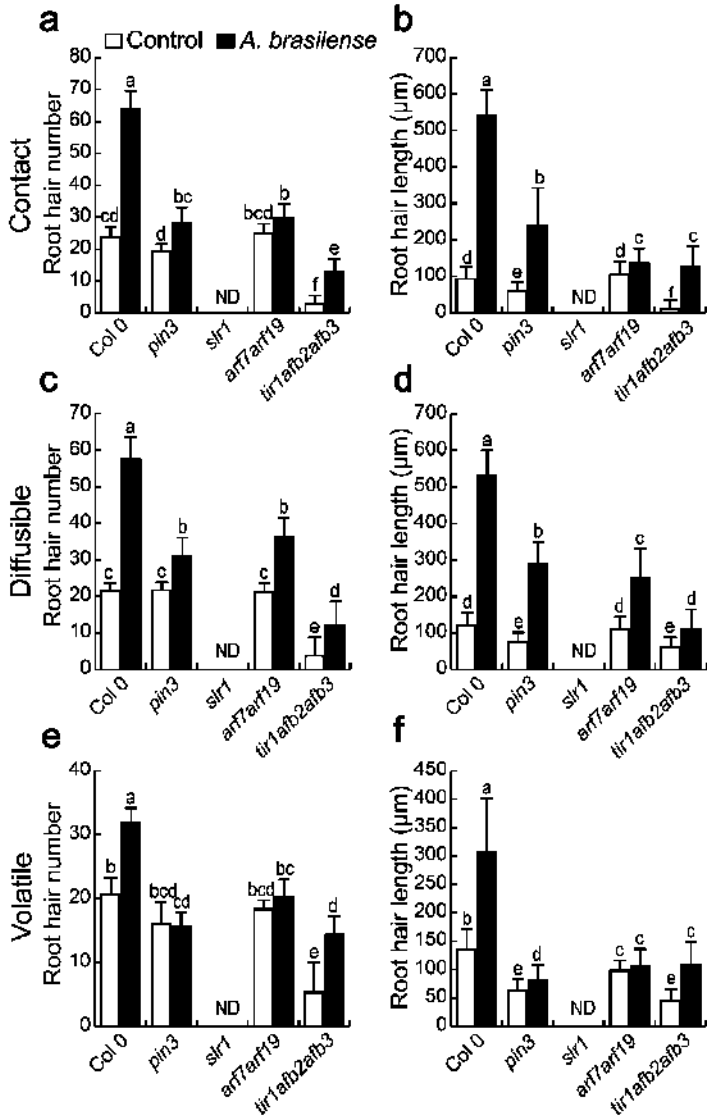


Figure S3. Effect of *A. brasilense* Sp245 on root hair formation of WT and mutant plants carrying mutations in genes of the auxin signaling pathway. Effects of bacterial inoculation on root hair number and length in direct contact (**a**, **b**), inoculated in the front of the growing primary root (**c, d**), and in divided Petri plates (**e, f**). The plants were analyzed 6 d after treatment. ND: not determined. n=30 to **a**, **c** and **e**; n=300 to **b**, **d** and **f**. The experiments were performed three times with similar results. The letters on the bars indicate statistically significant differences according to Tukey's HSD test, *P <0.05.*

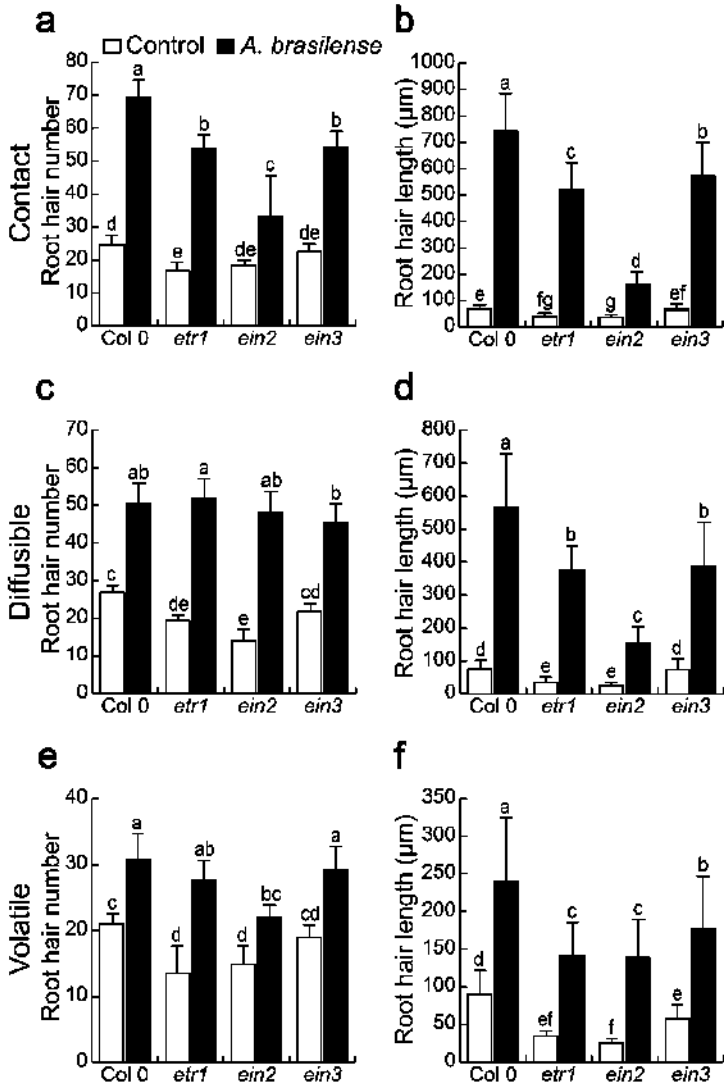


Figure S4. Effect of *A. brasilense* Sp245 on root hair formation of WT and mutant plants carrying mutations in genes of the ethylene signaling pathway. Effects of bacterial inoculation on root hair number and length in direct contact (**a**, **b**), inoculated in the front of the growing primary root (**c, d**), and in divided Petri plates (**e, f**). The plants were analyzed 6 d after treatment. n=30 to **a**, **c** and **e**; n=300 to **b**, **d** and **f**. The experiments were performed three times with similar results. The letters on the bars indicate statistically significant differences according to Tukey's HSD test, $P < 0.05$.

12.3 Capítulo 3

Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharides induce Target of Rapamycin signaling and growth in *Arabidopsis thaliana

Manuel Méndez-Gómez, Elda Castro-Mercado, Homero Reyes-de la Cruz, César Arturo Peña-Uribe, José López-Bucio, Ernesto García-Pineda

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, UMSNH, Morelia, Michoacán, México, CP 58195

Corresponding author:

Ernesto García-Pineda

Email: egpineda@umich.mx

Abstract

The Target of Rapamycin (TOR) protein kinase plays a pivotal role in metabolism and gene expression, which enables cell proliferation, growth and development. Lipopolysaccharides (LPS) are a class of complex glycolipids present in the cell surface of Gram-negative bacteria and mediate plant-bacteria interactions. In this study, we examined whether LPS from *Azospirillum brasilense* Sp245 affect *Arabidopsis thaliana* growth via a mechanism involving TOR. *A. thaliana* plants were treated with LPS and plant growth and development were analyzed in mature plants. Morphological and molecular changes as well as TOR expression and activity were analyzed in root tissues. LPS increased total fresh weight, root length and TOR::GUS expression in the root meristem. Phosphorylation of S6k protein, a downstream target of TOR, increased following LPS treatment, which correlated with increased or decreased expression of CycB1;1::GUS protein upon treatment with LPS or TOR inhibitor AZD-8055, respectively. Long term LPS treatment further increased the rosette size as well as the number of stems and siliques per plant, indicating an overall phytostimulant effect for these signaling molecules. Taken together, the results suggest that *A. brasilense* LPS play probiotic roles in plants influencing TOR-mediated processes.

Key words: Target of Rapamycin; *Arabidopsis thaliana*; lipopolysaccharides; root meristem; *Azospirillum brasilense.*

Abbreviations: LPS, lipopolysaccharides; TOR, target of rapamycin; GUS, β-glucuronidase; PGPR, plant growth promoting rhizobacteria; EXP7, expansin-7; CycB1;1, cyclin B1;1

1. Introduction

Azospirillum is a bacterial genus comprising plant-associated species that act as plant probiotics and thus represent a promising alternative to increase crop yield. Multiple traits underlay the Plant Growth Promoting properties of these rhizobacteria, including phytohormone production, uptake of mineral nutrients, biocontrol of pathogens, and mitigation of biotic and abiotic stress (Cassan and Díaz-Zorita, 2016), but the specific molecular signatures for the metabolic or genetic responses of plants to bacterial root colonization remain to be investigated.

Lipopolysaccharides (LPS) are components of the *Azospirillum* outer membrane (Choma et al. 1987). These compounds are typified by three canonically distinct domains. The lipophilic lipid A (LA) is a di-glucosamine that carries four to seven fatty acids. LA is linked to an oligosaccharide core region containing *O*-polysaccharide (OPS) having varying numbers of oligosaccharide repeats. OPS composition is highly diverse among bacterial species and strains (Ranf 2016). The OPS of *A. brasilense* Sp245 contain mainly rhamnose arranged in five units that repeat n-times (Fedonenko et al. 2002).

LPS are signaling molecules that mediate plant-bacteria interactions (Skvortsov and Ignatov, 1998), nevertheless their biological activity in the context of plant growth has not been examined in detail. Recent advances evidenced that the LPS of *Azospirillum brasilense* induce early growth responses and change root morphology in wheat seedlings (Vallejo-Ochoa et al. 2018; Sigida et al. 2019).

Cell proliferation and growth in eukaryotic cells are orchestrated by the Target of Rapamycin (TOR) signaling pathway. TOR is a highly conserved protein kinase originally discovered in yeast but found to be ubiquitous to worms, flies, mammals and plants

(Wullschleger et al. 2006). TOR links the nutritional status to the metabolic and hormonal readjustments that support basic cellular programs (Dobrenel et al. 2016; Menand et al. 2002). In *Arabidopsis thaliana*, TOR activity is important for all phases of the plant life cycle and is mainly expressed in rapidly proliferating tissues such as the root and shoot meristems (Menand et al. 2002, Méndez-Gómez et al. 2020).

The ribosomal protein S6K (S6 kinase) and 4EBP [eIF4E (eukaryotic initiation factor 4E)-binding protein] (Meyuhas and Dreazen 2009) are key TOR substrates mediating its cellular effects. S6K phosphorylates the S6 protein of the 40S ribosomal subunit to enhance mRNA translation by recruiting both translation initiation factors and tRNAs to mRNA (Wullschleger et al. 2006). Although our recent research has unraveled a direct link of root colonization by *A. brasilense* in TOR signaling in Arabidopsis (Méndez-Gómez et al. 2020), it is still unknown how TOR senses and reacts to specific bacterial metabolites or structural cell components. In the present study, we examined the biological effects of *A. brasilense* Sp245 LPS on TOR expression and activity in root meristems and growth of *Arabidopsis thaliana in vitro* and in soil.

2. Materials and Methods

2.1. Plant material and bacterial strains

Arabidopsis thaliana (Columbia-0, Col-0 ecotype), and transgenic lines *Exp7::uidA* (Cho and Cosgrove 2002), *pCycB1;1::uidA* (Colon-Carmona et al. 1999) and *TOR/tor-1* (Menand et al. 2002) were used in this study. Wild-type *Azospirillum brasilense* Sp245 was a kind gift from Dr. Gladys Alexandre (University of Tennessee, USA). The strain was maintained in

solidified LB medium, pH 7 (10 g/L peptone, 5 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl, supplemented with 0.3009 g/L $MgSO_4$ and 0.277 g/L $CaCl_2$; 15 g/L agar was added). All reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA).

2.2. Lipopolysaccharide extraction

A. brasilense cultures in the exponential phase were used to extract lipopolysaccharides. A pre-inoculum was first established from a colony from a fresh culture and inoculated in 3 mL liquid LB medium. The culture was incubated for 16 h (~ 1.0 OD_{600} nm) at 28 °C with rotation at 140 rpm. Then, 150 µL of the pre-inoculum was transferred to 50 mL liquid LB medium and incubated for 16 h at 28 °C with rotation at 140 rpm. Bacterial cultures were centrifuged at 3,800 g for 12 min at room temperature and the resulting pellets were used for LPS extraction as previously described (Renukadevi et al. 2012). Briefly, cell wall fractions were isolated by homogenizing the pellet in 5 mL sterile distilled water plus 5 mL phenol equilibrated with 10 mM Tris-HCl, pH 8 and incubating at 65 °C for 20 min with shaking. Subsequently, the samples were incubated at 4 °C for 24 h before dialysis for 3 days at 5 °C using deionized water. LPS was concentrated by alcohol precipitation with 0.15 M sodium acetate (final concentration) followed by addition of ice-cold 96% ethanol to yield a 1:4 final ethanol concentration. The mixture was incubated for 24 h at -20 °C. The pellet was then collected by centrifugation at 4,000 x *g* for 20 min and re-suspended in distilled water. LPS was stored at 4 °C until use.

2.3. TOR expression

TOR expression was analyzed using *TOR/tor-1* transgenic plants. *Arabidopsis* seeds were germinated for 3 days, transplanted in Petri dishes containing 0.2X MS solidified medium and after 6 days the roots were immersed for 24 h in 2 ml 0.2X MS liquid medium containing either 100 or 150 µg/mL LPS. Plants expressing the *uidA* reporter gene were stained with 0.1% X-Gluc (5-bromo-4-chlorium 3-indolyl, β-D-glucuronide) dissolved in phosphate buffer (NaH_2PO_4 and Na_2HPO_4, 0.1 M, pH 7), with 2 mM potassium ferrocyanide and 2 mM potassium ferricyanide overnight at 37 °C. For the analysis, plants were cleared and fixed as previously described (Malamy and Benfey 1997), mounted on glass slips and sealed with commercial nail varnish for observation and imaging by microscopy (Nomarski optics, Leica DFC450C). GUS staining intensity in the images was quantified using ImageJ according to Béziat et al. (2017). *TOR::GUS* expression intensity was quantified within a 50 x 400 µm rectangle, starting from the quiescent center and covering the transition and elongation zone.

2.4. TOR activity analysis

TOR activity was analyzed by examining S6K protein phosphorylation. *Arabidopsis* seedlings were treated as described in the previous section. Plant tissue (100 mg) was powdered in liquid nitrogen and re-suspended in 100 µL extraction buffer containing 50 mM HEPES, pH 7.6, 1 mM sodium vanadate, 1 mM sodium molybdate, 1 mM benzamidine, 20 mM NaF, 0.2 mM PMSF (in methanol), and 2 mM DTT. The sample was homogenized using a Vortex before centrifugation at 9,000 rpm for 30 min and 4 °C. The supernatant was transferred to a sterile Eppendorf tube. Total protein content was determined by the Bradford assay (Bradford 1976) and 20 µg total protein from each sample was separated by SDS-

PAGE (12%). After electrophoresis, the proteins were transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane, which was washed for 10 min with 0.15 M TBS-T buffer (50 mM Tris-HCl, 0.15M NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.4). Blots were blocked overnight with constant shaking in 5% skim milk in TBS-T and detected with mouse monoclonal antibodies against p70 S6 kinase α, or phospho-p70 S6 kinase α (Santa Cruz Biotechnology) diluted at 1:5,000 as the primary antibody. The membrane was washed at 4 °C with shaking, first with 0.15 M TBS-T, then with 1 M TBS-T, and finally with 0.15 M TBS-T. The membrane was then incubated for 2 h at 4 °C with constant shaking with anti-mouse IgG (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) diluted 1:10,000 in 0.15 M TBS-T as the secondary antibody. The membrane was washed 3 times for 5 min each with 0.15M TBS-T and developed with WesternSure PREMIUM Chemiluminescent Substrate (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) to detect horseradish peroxidase activity. Images were taken with a ChemiDoc^{TM} MP Imaging System.

For inhibitor treatments, root seedlings 6 days after transplant were dipped in 2 ml 0.2X MS liquid medium containing AZD-8055 (1 µM; final concentration) (Montané and Menand, 2013) either with or without 100 µg/mL LPS. S6K protein phosphorylation was analyzed 24 h after treatments. The effect of AZD-8055 on plant growth was analyzed by assessing germination and growth of *Arabidopsis* in Petri plates containing AZD-8055 (100 µL of a 10 mM stock solution in dimethyl sulfoxide [DMSO] added to 100 mL warm MS medium, which was distributed in Petri dishes and allowed to solidify). Equal volumes of DMSO were added as a control. Cell division and differentiation were evaluated 6 days after transplant using the transgenic plants *pCycB1;1::uidA* and *Exp7::uidA*, respectively, 24 h after treatments.

2.5. Lipopolysaccharides treatment and plant growth analysis

Seeds were disinfected with 95% (vol/vol) ethanol for 5 min, followed by 20% (vol/vol) bleach (Cloralex) for 5 min and then 5 washes with sterile distilled water. To synchronize germination, the seeds were stored at 4 °C for 48 hours and then germinated on agar plates containing 0.2X Murashige and Skoog (MS) medium, pH 7 containing 0.9 g/L MS salts, 0.6% (w/v) sucrose and 10 g/L Agar Plant TC (PhytoTechnology Laboratories, St. Lenexa, KS, USA). The plates were placed vertically in a growth chamber (Percival Scientific AR-95L) at 22 °C with photoperiod of 16 h light, 8 h darkness and light intensity of 100 µmol m^2 s^1. Four days after germination, the root seedlings were immersed for 5 h in solutions with 100 or 150 µg/mL LPS dissolved in 2 ml of MS medium at room temperature. The plants were then immediately and carefully transferred to trays with soil (1:1:3 perlite:vermiculite:peat moss) and incubated in a growth chamber under the same conditions used for germination. The seedlings were watered with 300 mL sterile water once a week and sprayed with 10 mL 100 or 150 µg/mL LPS twice a week for 1 month. Growth parameters were analyzed 53 days after transfer to the soil. The root system was carefully washed and photographed; the images were analyzed using WinRHIZO software with an EPSON Expression 11000XL scanner (Régent Instruments Inc., Québec, CA). The length of the root system was assessed using ImageJ.

2.6. Statistical analysis

All experiments were repeated at least three times with n=30. The data were analyzed using the STATISTICA program version 8.0.550. Univariate and multivariate analyses followed by a *post-hoc* test (Tukey's HSD) were used to test differences between treatments.

3. Results

3.1. LPS stimulate plant growth and TOR expression

To determine the possible bioactivity of LPS and investigate the molecular mechanisms involved in their cellular perception *A. thaliana* seedlings were treated with LPS at 100 µg/mL, a concentration previously reported to stimulate wheat seedling growth (Vallejo-Ochoa et al. 2018), and incubated for 24 h to measure fresh weight and total plant length. Increases in fresh weight and total length were stimulated by LPS 100 µg/mL relative to untreated control showing that LPS also promoted the growth of this plant (Fig. 1a).

We next analyzed the expression of TOR::GUS fusion in root meristems 24 h after treatment with 100 or 150 µg/mL LPS. TOR::GUS was highly expressed with 100 µg/mL LPS, but decreased with the 150 µg/mL treatment (Fig. 1b). The activity of TOR kinase was assessed by analyzing its phosphorylation target, S6K protein. Levels of phosphorylated S6K increased for the 100 µg/mL LPS treatment, whereas it remained comparable to the control in plants treated with 150 µg/mL LPS (Fig. 2a). AZD-8055 (1 µM), an ATP-competitive mTOR kinase inhibitor, reduced the amount of S6K phosphorylation induced by LPS (Fig. 2b). These results suggest that LPS activate the TOR signaling pathway.

To analyze the effect of LPS on cell division in root meristems, the expression of the reporter marker *CycB1;1::GUS* was analyzed. An increase in cell division in response to

treatment with 100 µg/mL, but not 150 µg/mL LPS, 24 h after treatment could be observed (Fig. 3a). C ell division was inhibited by AZD-8055 (Fig. 3b), and this inhibitor also repressed plant growth (Fig. 3c), suggesting that the TOR signaling pathway modulated cell division and plant growth promoted by *A. brasilense* LPS.

3.2. Effect of LPS on cell differentiation

The effect of LPS on root cell differentiation was further analyzed by examining changes in EXP7::GUS protein expression. GUS staining indicated that EXP7 protein levels decreased in response to treatment with LPS, but the decrease was more pronounced for the 100 µg/mL treatment (Fig. 4). Interestingly, the distance from the meristem to the first root hair notably increased at 100 µg/ml LPS relative to untreated plants, which could be associated with the observed increase in root length.

3.3. LPS stimulate plant growth and tissue differentiation

To follow the effect of LPS on plant development into mature plants, *Arabidopsis* seedlings were treated with either 100 or 150 µg/mL LPS as indicated in the Materials and Methods, and the growth of different plant organs and tissue differentiation were analyzed 45 and 53 days later. At 45 days after treatment with both LPS concentrations, plant foliage was visually larger than that of untreated plants, with a more pronounced effect seen for 100 µg/mL LPS. On day 53 after treatment, enhanced ripening of siliques was observed in LPS-treated plants compared to untreated controls (Fig. 5a). In terms of growth parameters, treatment with LPS at both concentrations was associated with increased rosette size, number

of stems and the size of the first leaf (Fig. 5b, c, d). These observed effects were greaterfor 100 µg/mL LPS compared to 150 µg/mL LPS.

Plant tissue differentiation was analyzed by determining the number of siliques produced and their degree of ripening. The number of siliques per plant increased with both LPS concentrations compared to untreated plants, especially at 100 µg/mL (Fig. 5e). Overall, silique ripening was stimulated by LPS treatment compared to untreated plants (Fig. 5f).

Analysis of plant root systems 53 days after treatment showed that plants treated with LPS had a more developed root system than did untreated plants (Fig. 5g). Moreover, the root length was increased with LPS (Fig. 5h). This enhancement in root system development associated with LPS treatment correlates with overall plant growth.

4. Discussion

Lipopolysaccharides, which are present in the outer membrane of Gram negative bacteria, are recognized as biologically active molecules for the activation of immune responses in plants and mammals (Ranf, 2016). The Gram negative bacterium *Azospirillum brasilense* has been considered as a Plant Growth Promoting Rhizobacterium (PGPR), but the effects of LPS on plant growth remained unclear. A recent study showed that wheat plants sprayed with *A. brasilense* LPS (100 µg/mL) had altered plant growth and development manifested as increased dry weight, leaf length and spike formation as well as accelerated plant phase transitions (Chavez-Herrera et al. 2018).

Here, we showed that *A. brasilense* LPS promoted *A. thaliana* growth and development, which implies a ubiquitous activity of LPS regarding their probiotic effects. Interestingly, plants treated with LPS showed increased expression of TOR protein and phosphorylation of

S6K, the target protein of TOR. It means that possibly, this key signaling pathway is responsive to structural bacterial signatures for the modulation of the cell cycle, influencing the activity of root meristems. Thus, TOR can sense structural biomolecules such as LPS derived from rhizobacteria along as nutrients, energy, light and phytohormones, already reported stimuli necessary for plants to complete their life cycle (Dobrenel et al. 2016).

In this study we also observed that *A. brasilense* LPS stimulated whole plant development as shown by increased EXP7::GUS expression in the root, and increased rosette size, and the number of siliques per plant. These changes may have resulted from the increase in TOR expression and activity. This finding is consistent with results from earlier studies showing that growth of *Arabidopsis* is associated with the level of expression of TOR kinase such that a decrease or increase in TOR expression results in dynamic responses in organs (shoots and roots) that impact root architecture and seed production (Deprost et al. 2007; Méndez-Gómez et al. 2020).

The mechanism that links LPS perception in plants to TOR signaling is currently unclear. Although there are studies concerning how plant cells recognize LPS, they mainly focused on LPS-mediated induction of defense responses to pathogenic bacteria such as *Pseudomonas spp.* and *Xanthomonas campestris* (Desaki et al. 2006; Zeidler et al. 2004). In *Arabidopsis*, perception of LPS from these two pathogenic bacteria is mediated by the RLK LORE (Lipo-Oligosaccharide-specific Reduced Elicitation) protein, which belongs to the plant-specific class of bulb-type lectin S domain-1 kinases (SD-RLKs), thus suggesting that a receptor that recognizes LPS could be involved in responses to these bacteria (Ranf et al. 2015). However, LORE cannot detect enterobacterial or *Burkholderia cepacia* LPS (Madala et al. 2012), which indicates that different receptors for LPS derived from different bacteria

may exist. How downstream cellular responses stimulated by LPS perception could activate TOR signaling is an issue that requires further investigation.

A major response to LPS purified from *Pseudomonas aeruginosa* is the production of reactive oxygen species (ROS) in *Arabidopsis*, but this response is only partially dependent on LORE (Shang-Guan et al. 2018). LPS from *A. brasilense* also increased ROS production in root wheat seedlings, and sensing of LPS appears to be important for increased plant growth (Vallejo-Ochoa et al. 2018). Whether LPS increases TOR activity through ROS production in plants is unknown. However, in mammalian cells, short term ROS treatment could stimulate mTORC1 activity, whereas long-term ROS treatment decreased mTORC1 activity *in vivo* and in multiple cell lines (Li et al. 2010). Our results open the door for future studies to investigate the molecular mechanism(s) by which LPS from the beneficial rhizobacteria *A. brasilense* can stimulate plant growth via the TOR signaling pathway.

Author contribution statement

MMG and CAPU conducted the experiments. ECM contributed with technical support to the experiments. MMG and EGP conceived and designed the research. EGP, HRC and JLB wrote the manuscript. EGP supervised all the work done. All authors read and approved the manuscript

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Founding

This study was supported by funds from the Coordinación de la Investigación Científica, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México. Work also was supported by the CONACYT grant (276783) to MMG.

References

Béziat, C., Barbez, E., Feraru, M.I., Lucyshyn, D., Kleine-Vehn, J., 2017. Light triggers PILS-dependent reduction in nuclear auxin signalling for growth transition. Nat. Plants 3, 17105.

Bradford, M.M., 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

Cassan, F., Diaz-Zorita, M., 2016. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. Soil Biol. Biochem. 103, 117-130.

Chavez-Herrera, E., Hernandez-Esquivel, A.A., Castro-Mercado, E., Garcia-Pineda, E., 2018. Effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharides on wheat plant development. J. Plant Growth Regul. 37, 859-866.

Cho, H.T., Cosgrove, D.J., 2002. Regulation of root hair Initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis*. Plant Cell 14, 3237-3253.

Choma, A., Russa, R., Mayer, H., Lorkiewicz, Z., 1987. Chemical analyses of *Azospirillum* lipopolysaccharides. Arch. Microbiol. 146:341-345.

Colon-Carmona, A., You, R., Haimovitch-Gal, T., Doerner, P., 1999. Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. Plant J. 20, 503-508.

Deprost, D., Lei Yao, L., Sormani, R., Moreau, M., Leterreux, G., Nicola, M., Bedu, M., Robaglia, C., Meyer, C., 2007. The *Arabidopsis* TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. EMBO reports 8, 864-870.

Desaki, Y., Miya, A., Venkatesh, B., Tsuyumu, S., Yamane, H., Kaku, H., Minami, E., Shibuya, N., 2006. Bacterial lipopolysaccharides induce defense responses associated with programmed cell death in rice cells. Plant Cell Physiol. 47, 1530-40.

Dobrenel, T., Caldana, C., Hanson, J., Robaglia, C., Vincentz, M., Veit, B., Meyer, C., 2016. TOR signaling and nutrient sensing. Annu. Rev. Plant Biol. 67, 261-285.

Fedonenko, Y. P., Zatonsky, G.V., Konnova, S.A., Zdorovenko, E.L., Ignatov, V.V., 2002. Structure of the O-specific polysaccharide of the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* Sp245. Carbohydr. Res. 337, 869-872.

Fomsgaard, A., Freudenberg, M.A., Galanos, C., 1990. Modification of the silver staining technique to detect lipopolysaccharide in polyacrylamide gels. J**.** Clin**.** Microbiol**. 28,** 2627-2631**.**

Li, M., Zhao, L., Liu, J., Liu, A., Jia, C., Ma, D., Jiang, Y., Bai, X., 2010. Multi-mechanisms are involved in reactive oxygen species regulation of mTORC1 signaling. Cell. Signal. 22, 101469-1476.

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 apexes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 114, 2765-2770.

Madala, N.E., Molinaro, A., Dubery, I.A., 2012. Distinct carbohydrate and lipid-based molecular patterns within lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia* contribute to defense-associated differential gene expression in *Arabidopsis thaliana*. Innate Immun.18, 140-54.

Malamy, J.E., Benfey, P.N., 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. Development 124, 33-44.

Menand, B., Desnos, T., Nussaume, L., Berger, F., Bouchez, D., Meyer, C., Robaglia, C., 2002. Expression and disruption of the *Arabidopsis* TOR (target of rapamycin) gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 6422-6427.

Méndez-Gómez, M., Castro-Mercado, E., Peña-Uribe, C.A., Reyes-de la Cruz, H., López-Bucio, J., García-Pineda E., 2020. TARGET OF RAPAMYCIN signaling plays a role in Arabidopsis growth promotion by *Azospirillum brasilense* Sp245. Plant Sci. 293, 110416.

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

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

Ranf, S., 2016. Immune sensing of lipopolysaccharide in plants and animals: same but different. PLoS Pathog. 12(6): e1005596.

Ranf, S., Gisch, N., Schäffer, M., Illig, T., Westphal, L., Knirel, Y.A., Sánchez-Carballo, P.M., Zähringer, U., Hückelhoven, R., Lee, J., Scheel, D., 2015. A lectin S-domain receptor kinase mediates lipopolysaccharide sensing in *Arabidopsis thaliana*. Nat. Immunol. 16, 426-33.

Renukadevi, K.P., Angayarkanni, J., Karunakaran, G., 2012. Extraction and characterization of lipopolysaccaride from *Serratia rubidaea* and its cytotoxity on lung cancer cell line NCI-H69. Acta Tech Corviniensis 2, 97-101.

Shang-Guan, K., Wang, M., Htwe, N.M.P.S., Li, P., Li, Y., Qi, F., Zhang, D., Cao, M., Kim, C., Weng, H., Cen, H., Black, I. M., Azadi, P., Carlson, R.W., Stacey, G., Liang, Y., 2018. Lipopolysaccharides trigger two successive bursts of reactive oxygen species at distinct cellular locations. Plant Physiol. 176, 2543-2556.

Sigida, E.N., Fedonenko, Y.P., Shashkov, A.S., Toukach, P.V., Shelud'ko, A.V., Zdorovenko, E.L., Knirel, Y.A., Konnova, S.A., 2019. Structural studies of O-specific polysaccharide(s) and biological activity toward plants of the lipopolysaccharide from *Azospirillum brasilense* SR8. Int. J. Biol. Macromol. 126, 246-253.

Skvortsov, I.M., Ignatov, V.V., 1998. *Extracellular polysaccharides and polysaccharide-containing biopolymers from* Azospirillum *species: properties and the possible role in interaction with plant roots*. FEMS Microbiol. Lett. 165, 1223-229.

Vallejo-Ochoa, J., López-Marmolejo, M., Hernández-Esquivel, A.A., Méndez-Gómez, M., Suárez-Soria, L.N., Castro-Mercado, E., García-Pineda, E., 2018. Early plant growth and biochemical responses induced by *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharides in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings are attenuated by procyanidin B2. Protoplasma 255, 685-694.

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

Zeidler, D., Zähringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., Hutzler, P., Durner, J., 2004. Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101, 15811-6.

Figures

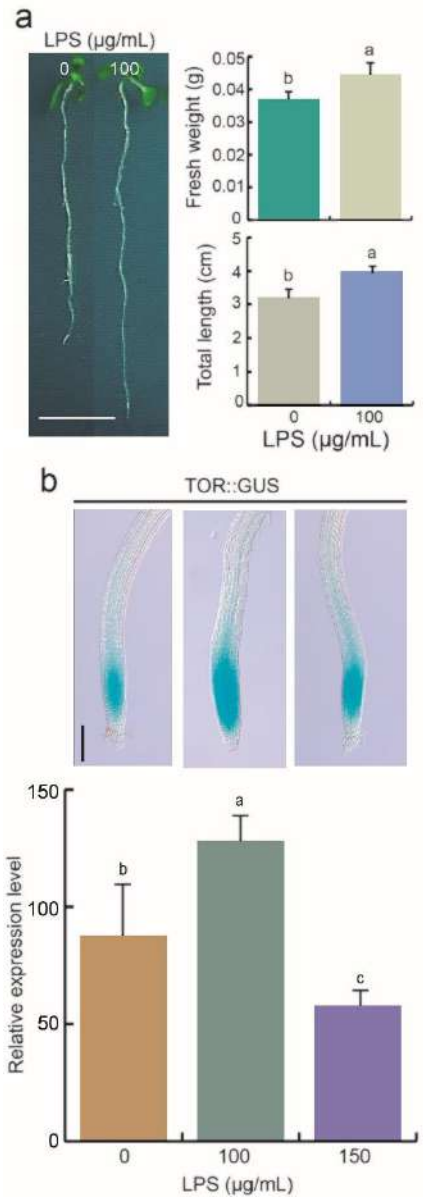


Figure 1. Effect of LPS on plant growth and TOR expression. **a**. Photography of seedling after LPS treatment and analysis of plant growth. Bar = 1 cm. **b**. TOR expression in root meristem. Bar = 200 μm. The letters on the bars indicate significant difference (Tukey's HSD test; $P<0.05$).

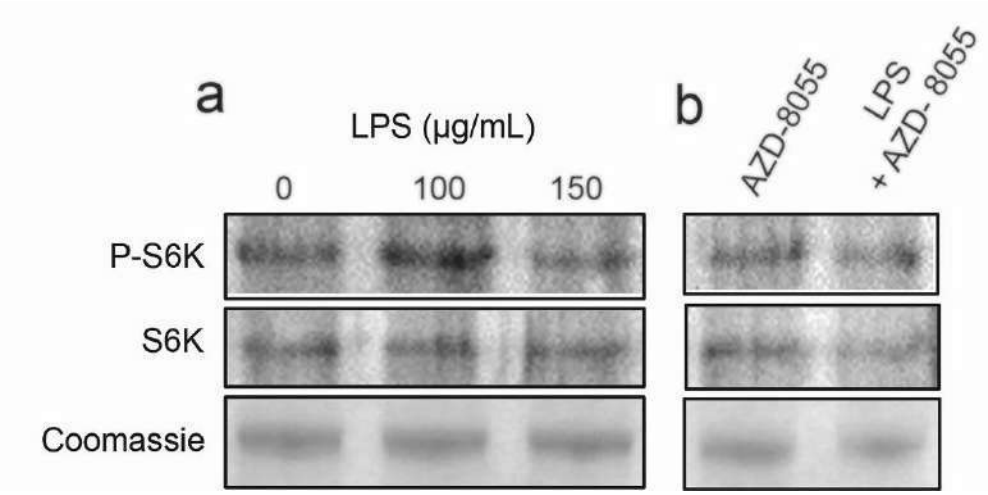


Figure 2. **a**. Phosphorylation of the S6K protein after LPS treatment. **b**. Effect of the TOR inhibitor AZD-8055 on the S6K phosphorylation stimulated by LPS. LPS were added at 100 µg/mL and the inhibitor at 1 µM. To all experiments the results were analyzed 24 h after treatments.

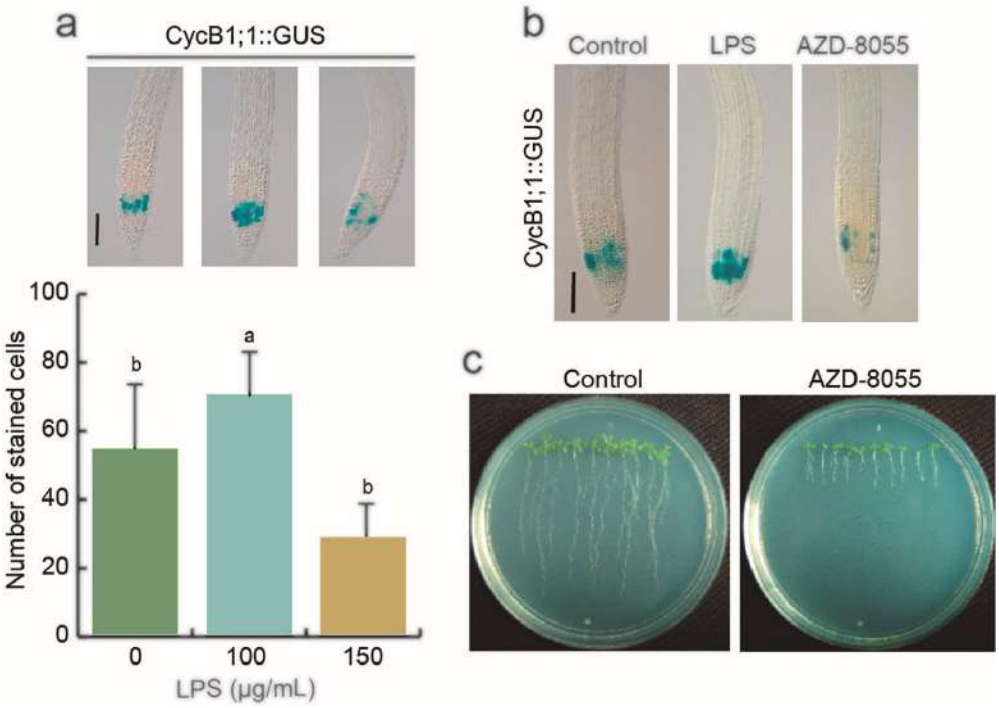


Figure 3. **a**. Effect of LPS on the cell division in root meristem. **b**. Effect of AZD-8055 on cell division and on plant growth (**c**). LPS were added at 100 µg/mL and the inhibitor at 1 µM. Bar = 200 µm. The letters on the bars indicate significant difference (Tukey's HSD test; $P<0.05$).

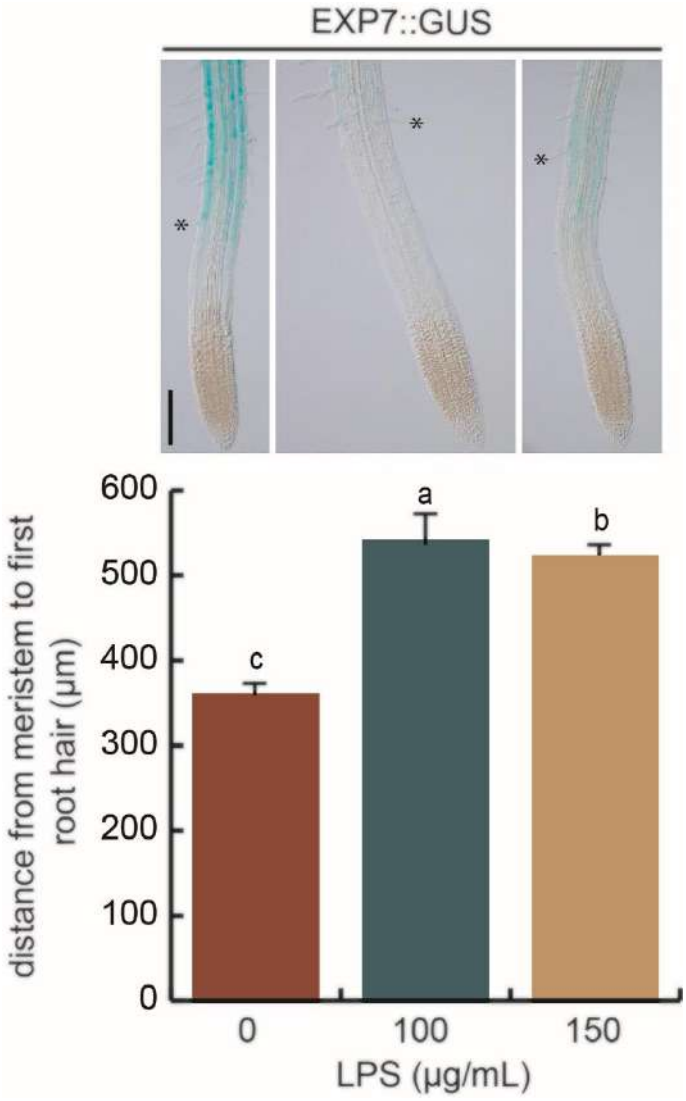


Figure 4. Expansin expression in root. The asterisk indicate the first root hair. Bar = 200 μm. The letters on the bars indicate significant difference (Tukey's HSD test; $P<0.05$).

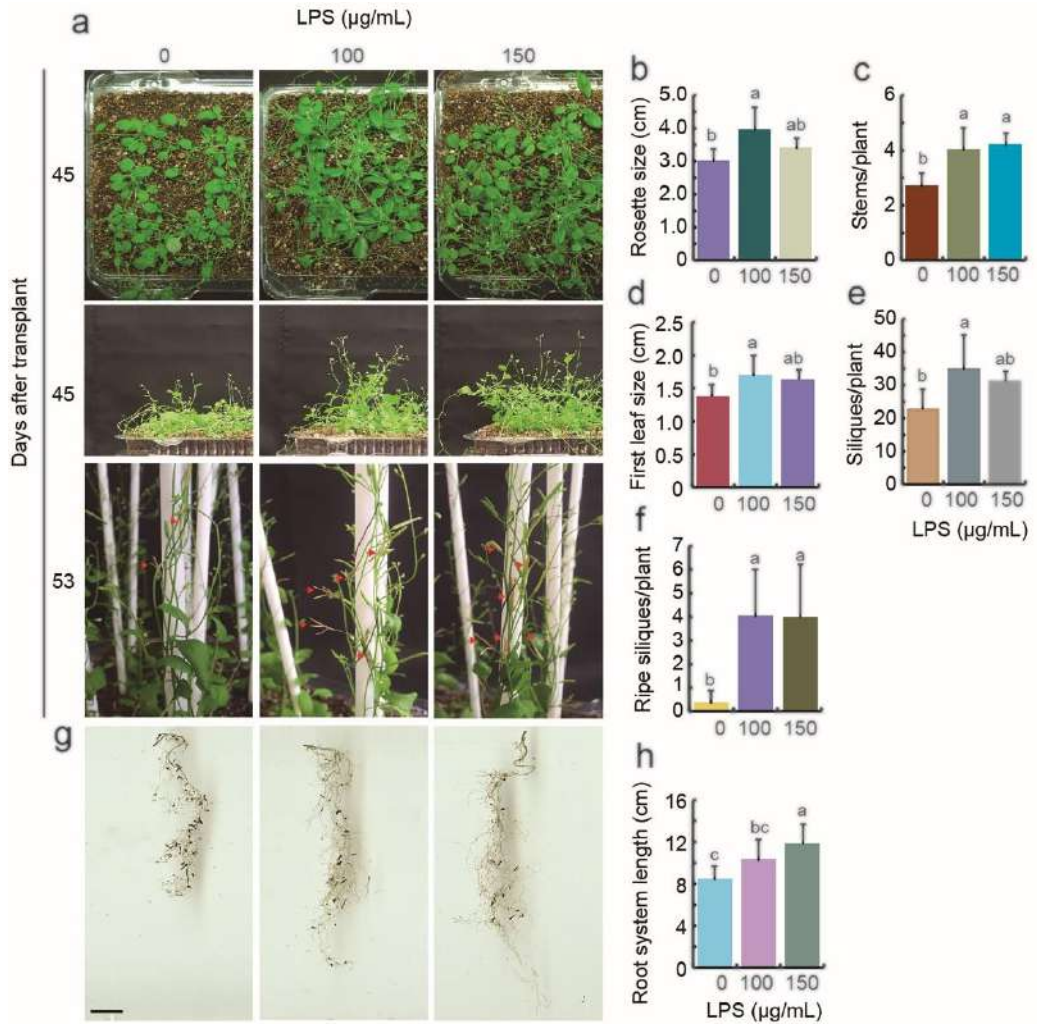


Figure 5. Effect of LPS on whole plant growth and development. **a**. Representative photos showing the effect of LPS on foliage. **b-f**. Quantitative analysis on rosette size, stems by plant, first leaf size, siliques by plant and ripe siliques by plant. **g**. Representative photo of the effect of LPS on the root development. **h**. Quantitative analysis of root system length. The letters on the bars indicate significant difference (Tukey's HSD test; $P<0.05$).

12.4 Capítulo 4

Resultados adicionales

El papel de las citocininas en el crecimiento vegetal estimulado por *Azospirillum brasilense* Sp245

El papel de las citocininas durante la interacción se analizó utilizando la línea trasgenica *ARR5:uidA,* y mutantes en los receptores AHKs, empleando los tres sistemas de interacción mencionados en el **Capítulo 2**.

Seis días después de la inoculación, *Azospirillum* disminuyó ligeramente la expresión de *ARR5:uidA* en el follaje en los tres sistemas (**Figura 1A**). En contraste, se observó un incremento en la expresión en el sistema radical (**Figura 1B**). Éste incremento fue más evidente en el sistema radical de las plantas en contacto directo. Al analizar con más detalle el meristemo de la raíz primaria, se observó un aumento en la expresión principalmente en la columela, en el centro quiescente, y en la zona de elongación en los tres sistemas. En la condición de contacto directo, la expresión fue mucho mayor y se extendió hacia la vasculatura de la raíz (**Figura 1C**).

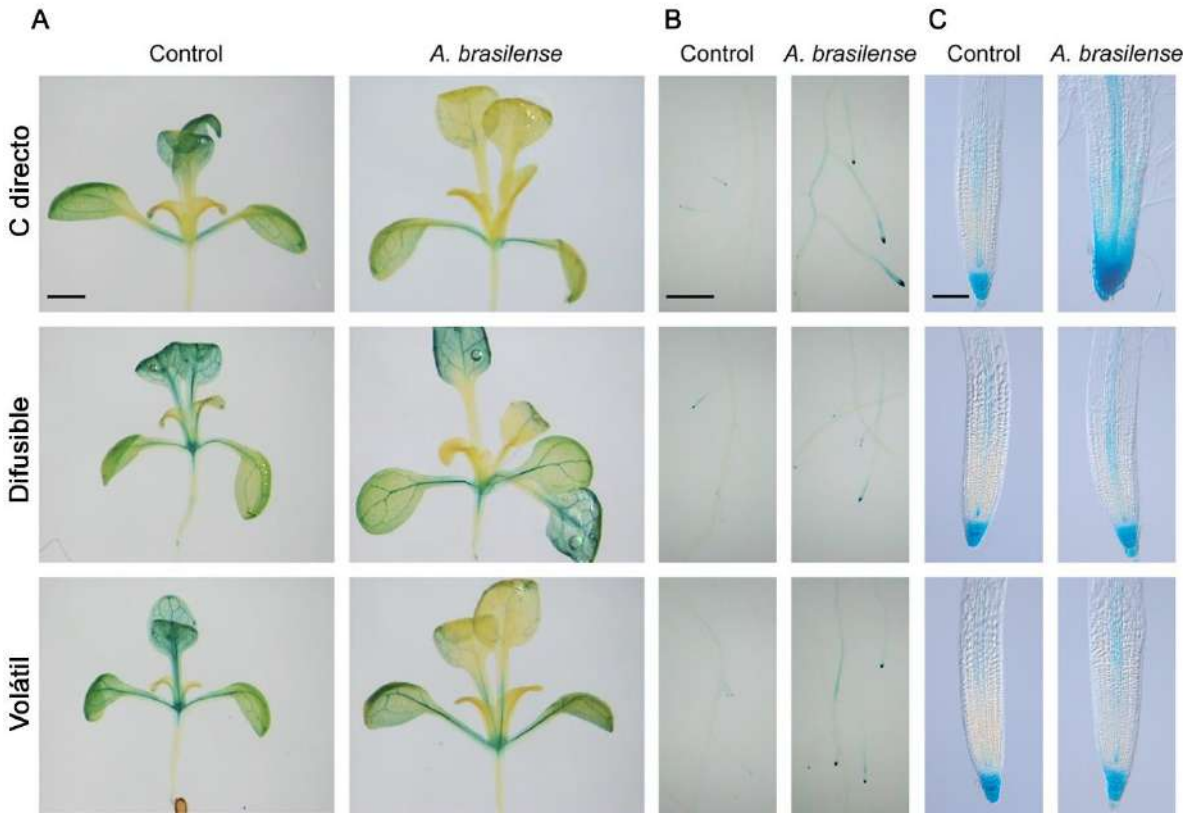


Figura 1. Efecto de *Azospirillum* sobre la expresión del marcador de respuesta a citocininas *ARR5:uidA*. Expresión de *ARR5:uidA* en hojas (A), en el sistema radical (B), y en el meristemo de la raíz primaria (C). Barra 1 mm para A y B. Barra 100 µm para C. Las plantas fueron inoculadas con $1x10^3$ UFC/ml y analizadas 6 días después de la inoculación. Las plantas fueron teñidas con X-Gluc por 12 horas. El experimento se realizó al menos tres veces con resultados similares. n= 20.

Al evaluar el crecimiento y desarrollo de las plantas mutantes, la rizobacteria fue incapaz de estimular el crecimiento del follaje en las mutantes *ahk2-2ahk3-3* y *cre1-12ahk2-2ahk3-3* (**Figura 2 A y B**), como se observó en el peso fresco del follaje (**Figura 3**). Este resultado fue similar en los tres sistemas.

La longitud de la raíz, el incremento en la formación de raíces laterales y pelos radiculares estimulado por *Azospirillum* no se ve afectado en la simple y doble mutante (*ahk2-2ahk3-3*). No obstante, la estimulación se vé severamente afectada en la triple mutante *cre1-12ahk2-2ahk3-3* (**Figura 2C, 3 y 4**). Reflejándose en una disminución en el peso fresco tanto del follaje como de la raíz (**Figura 3**).

En conjunto, estos resultados indican la participación de las citocininas en la promoción del crecimiento vegetal estimulado por *Azospirillum brailense* Sp245, principalmente en la formación del follaje.

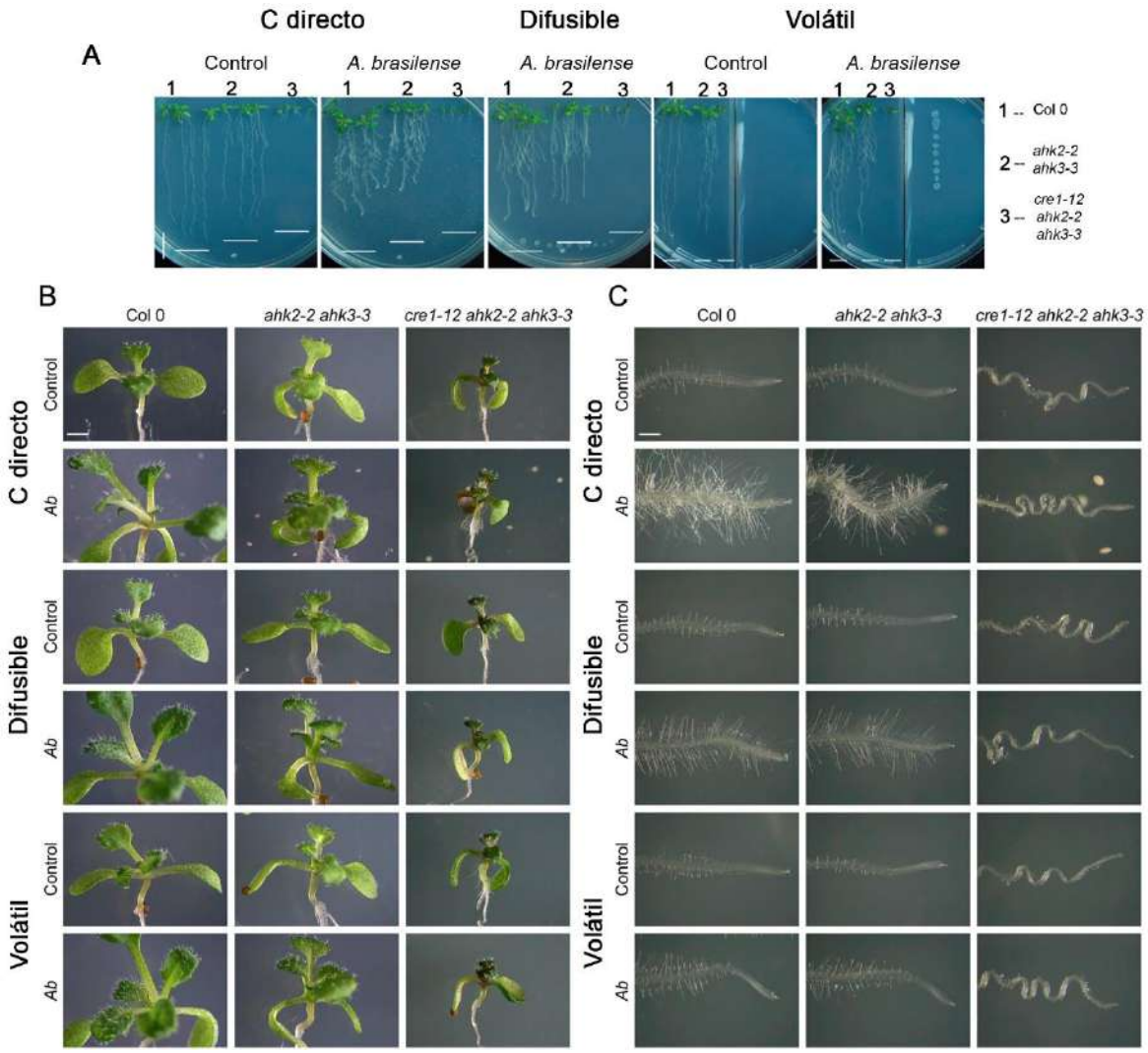


Figura 2. Efecto de *Azospirillum* sobre el crecimiento de mutantes en la respuesta a citocininas. A. Imagen representativa de las plantas mutantes *ahk2-2ahk3-3* y *cre1-12ahk2-2ahk3-3*. B. Desarrollo del follaje. C. Formación de los pelos radiculares. Las plantas fueron inoculadas con $1x10^3$ UFC/ml y analizadas 6 días después de la inoculación. Los experimentos se realizaron al menos tres veces con resultados similares. Ab: *Azospirillum brasilense*. n= 30.

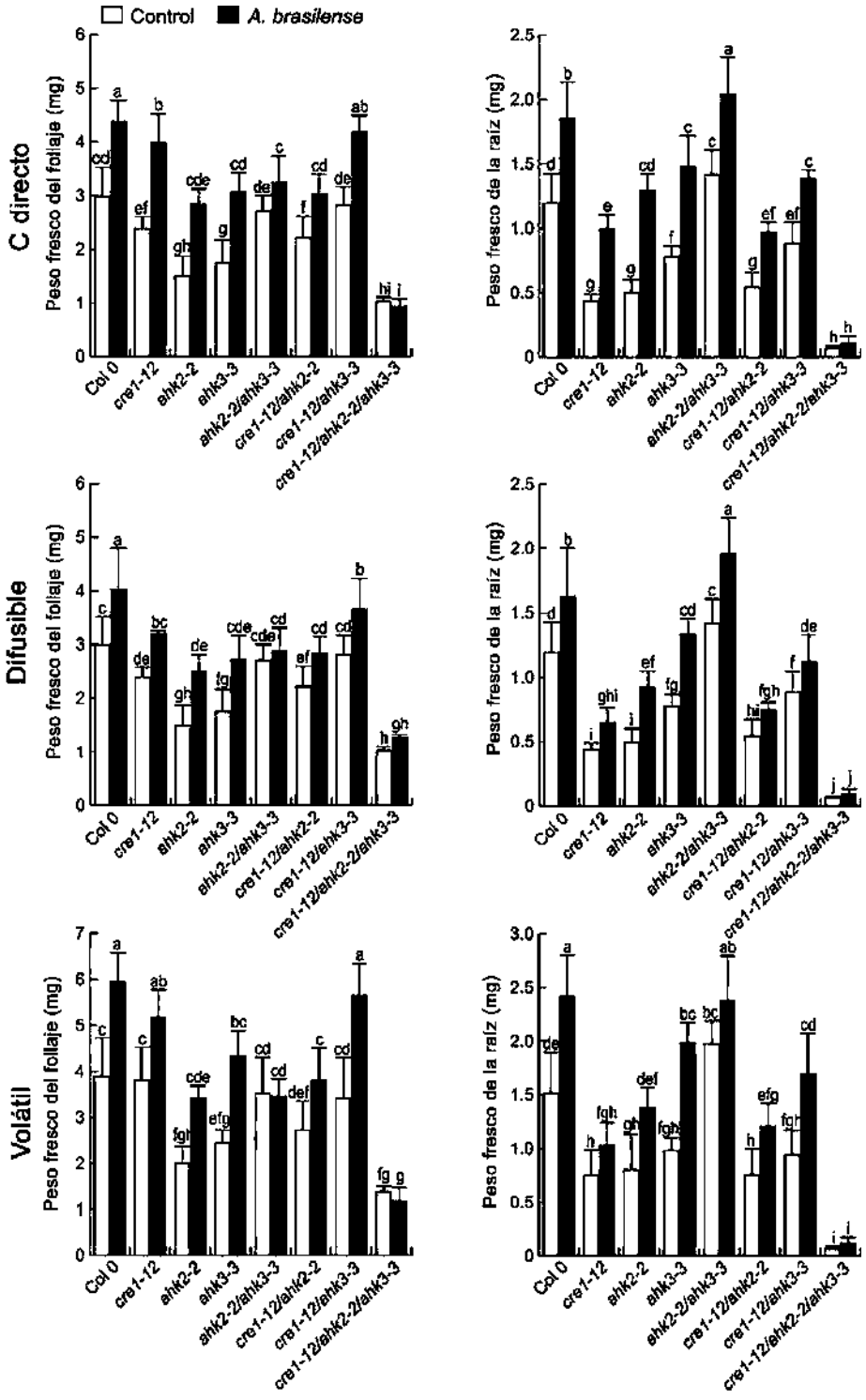


Figura 3. Peso fresco del follaje y de la raíz de plantas con mutaciones en la señalización de las citocininas. La concentración del inóculo que se utilizó fue de $1x10^3$ UFC/ml y se analizó 6 dias despues de la inoculación. Los experimentos se realizaron al menos tres veces con resultados similares. n= 6 con 5 plantas. Las letras sobre las barras indican diferencia significativa de acuerdo a *Tukey HSD P< 0.05*.

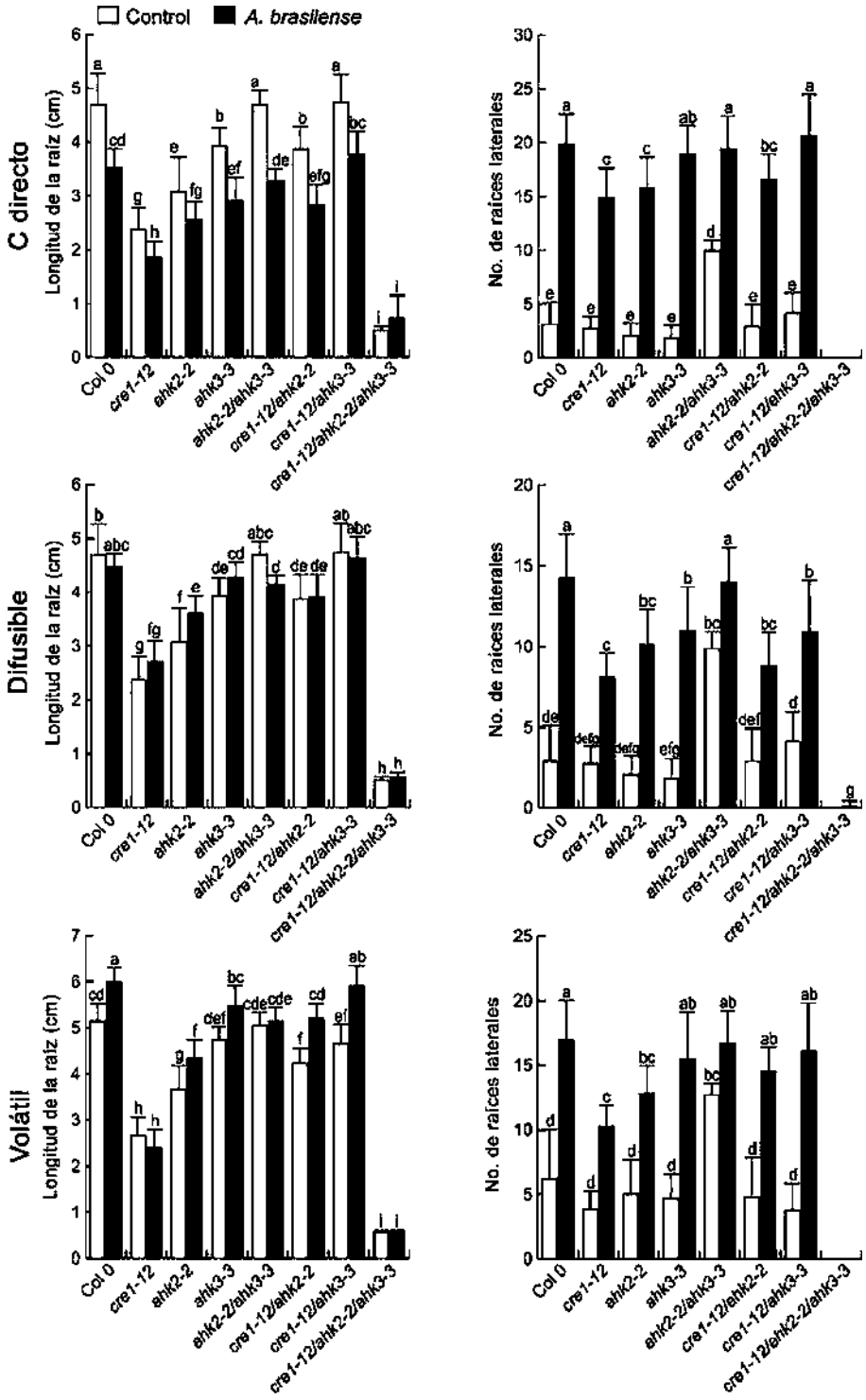


Figura 4. Longitud de la raíz primaria y formación de raíces laterales en plantas con mutaciones en la señalización de las citocininas. La concentración del inóculo que se utilizó fue de $1x10^3$ UFC/ml y se analizó 6 dias despues de la inoculación. Los experimentos se realizaron al menos tres veces con resultados similares. n= 30. Las letras sobre las barras indican diferencia significativa de acuerdo a *Tukey HSD P< 0.05*.

13. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las plantas interactúan constantemente con una gran cantidad de microorganismos que pueden perjudicar o mejorar el crecimiento vegetal. Las PGPR son un grupo de bacterias que mejoran el crecimiento vegetal a través de diferentes mecanismos como la fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas, solubilización de nutrientes, producción de compuestos volátiles y difusibles, inducción de defensa, y antagonismo con patógenos (Vacheron et al., 2013; Mendes et al., 2017). El género *Azospirillum* pertenece a este grupo de rizobacterias, y actualmente se está utilizando como biofertilizantes en cultivos de maíz y trigo (Cassan & Diaz-Zorita, 2016). Tiene la capacidad de fijar nitrógeno, producir fitohormonas, solubilizar fosfatos e inducir respuesta defensa en la planta. No obstante, se ha encontrado que la fijación de nitrógeno por esta bacteria, contribuye menos en la estimulación del crecimiento vegetal. Por lo tanto, se sugiere que la producción de la fitohormona auxina (ácido indol acético) es el principal mecanismo por el cual estimula el crecimiento vegetal. Aunque algunos autores indican que la capacidad promotora depende de una compleja interacción entre los mecanismos antes mencionados (Bashan & De-Bashan, 2010; Cassan & Diaz-Zorita, 2016). Un estudio reciente, ha demostrado que *A. brasilens*e Cd tiene la capacidad de producir compuestos volátiles, que promueven el crecimiento de algas verdes (Amavizca et al., 2017). No obstante, la señalización activada por estos compuestos no se ha analizado en plantas. Además, se ha demostrado que los lipopolisacáridos de la membrana celular de *A. brasilense* inducen respuestas bioquímicas, la división celular en el meristemo de la raíz primaria y aceleran el crecimiento vegetativo de plantas de trigo (Evseeva et al., 2011; Vallejo-ochoa et al., 2017; Chávez et al., 2018).

La mayoría de los estudios realizados con *Azospirillum spp.*, se ha hecho en condiciones de campo o *in vitro* donde la bacteria coloniza a la planta, mientras que la participación de compuestos difusibles y volátiles no han sido determinadas. Por lo tanto, en este trabajo se analizó el efecto de *A. brasilense* Sp245 bajo diferentes tipos de interacción y la participación de la proteína TOR sobre el crecimiento de *A. thaliana*. Para ello se establecieron tres tipos de interacción: 1) Contacto directo, 2)

Difusibles, y 3) Volátiles. En los tres tipos de interacción, la bacteria promovió el crecimiento vegetal, indicando que puede usar diferentes mecanismos de promoción del crecimiento vegetal. No obstante, el fenotipo de la planta en cada situación fue diferente. El fenotipo observado en condiciones de contacto directo es similar al reportado en plantas de trigo y *A. thaliana* inoculadas con *Azospirillum spp.,* o tratadas con ácido indol acético (Dobbelaere et al., 1999; Spaepen et al., 2008, 2014). Por lo tanto, el fenotipo observado en este sistema puede deberse a la producción de AIA o la combinación de otras fitohormonas producidas por esta bacteria. Por otro lado, el fenotipo observado en condiciones difusibles puede deberse a la difusión gradual de compuestos como el AIA producidos por la bacteria. Finalmente, la estimulación del crecimiento vegetal en condiciones volátiles, indica su contribución durante este fenómeno. Aunque no se ha determinado el perfil de compuestos orgánicos volátiles (COV) producidos por *A. brasilense* Sp245, recientemente, se ha demostrado que *A. brasilense* Cd induce la producción de lípidos, carbohidratos, clorofila a y el crecimiento de *Chlorella sorokiniana* a través de la producción de COV, tales como la acetoina y el butanediol (Amavizca et al., 2017). Estos mismos COV se reportan también en otras rizobacterias con capacidad de promover el crecimiento de las plantas (Ryu et al., 2003; López-Bucio et al., 2007).

Analizando más a detalle el fenotipo de las plantas en las tres condiciones, encontramos que la formación y desarrollo del follaje fue estimulado de manera similar en los tres tipos de interacción, aunque se observa que el follaje presenta un mayor tamaño con la producción de volátiles. Esta diferencia puede deberse por la ausencia de algún compuesto que afecte el crecimiento, como en el caso de contacto directo y compuestos difusibles.

El efecto más notorio de la interacción, se observó en el sistema radicular. En los tres tipos de interacción se observó un incremento en la formación de las raíces laterales y pelos radiculares. Pero, la longitud de la raíz primaria se afectó de manera diferente (Spaepen et al., 2014). Está documentado que el crecimiento de la raíz es controlado por eventos de división y diferenciación celular que ocurren en

el meristemo de la raíz (Petricka et al., 2012; De Lucas & Brady, 2013; Moubayidin et al., 2013). Además, el factor de transcripción *WOX5* presente en el centro quiescente, es un elemento importante en el mantenimiento del meristemo y de la identidad de las células iniciales, ya que la pérdida de la función de WOX5 causa la diferenciación del meristemo de la raíz (Sarkar et al., 2007; Aichinger et al., 2012; Forzani et al., 2014). Al evaluar la división celular en el meristemo de la raíz, empleando el reportero *CycB1;1:GUS,* se observó una reducción en el tamaño del meristemo y en el número de células en división, en las plantas expuestas al contacto directo y compuestos difusibles, mientras que con condiciones volátiles se observa un incremento. La expresión de *WOX5* también se afectó de manera similar a la división celular, con una disminución en contacto directo y un incremento con compuestos volátiles. Por lo tanto, el efecto de *A. brasilense* sobre la longitud de la raíz, se debe a que interviene en los procesos de división celular y diferenciación celular en el meristemo de la raíz principal. Estimulando así, la formación de los pelos radiculares cerca del meristemo y una alta expresión de *AtEXP7:GUS* que indica diferenciación celular, en condiciones de contacto directo.

Las fitohormonas están implicadas en diversas interacciones planta-microorganismo. Spaepen et al., 2014, demostró que *A. brasilense* Sp245 estimula la expresión del gen inducible por auxinas *DR5:GUS* en la raíz y ligeramente en el follaje de plantas de *A. thaliana*. En nuestros estudio, observamos una alta estimulación de *DR5:GUS* principalmente en la raíz y ligeramente en el follaje en condiciones de contacto directo. Mientras que en difusibles y volátiles se observó un ligero incremento tanto en la raíz como en el follaje. Respuestas similares se observaron con el gen de respuesta a citocininas *ARR5:GUS*, donde la expresión se incrementó más en la raíz en condiciones de contacto directo, parecido a la adición exógena de la citocinina sintética (Lopez-Bucio et al., 2007a). Estos resultados son interesantes ya que indican la participación conjunta de la señalización de las auxinas y citocininas en los tres tipos de interacción, y sería interesante determinar si la respuesta de las plantas se debe a las auxinas y citocininas producidas por la bacteria o la planta. Además, tomando en cuenta los diferentes fenotipos del sistema radicular en los tres tipos de interacción, estas

diferencias posiblemente se deban también a la redistribución de la relación auxina-citocinina en el meristemo de la raíz durante la interacción. Esta idea es apoyada por diversos reportes que indican que la división y diferenciación celular que controla el tamaño del meristemo de la raíz es regulada por la acción antagónica de las fitohormonas auxinas y citocininas (Blilou et al., 2005; Dello Ioio et al., 2007, 2008).

El papel de la señalización de las fitohormonas en el crecimiento y desarrollo vegetal, se analizó adicionalmente utilizando mutantes en la percepción y señalización de las auxinas, citocininas y etileno en los tres tipos de interacción. Se ha reportado que el transporte de las auxinas, la síntesis y la señalización de las auxinas y citocininas controlan la formación y el mantenimiento del meristemo de la parte aérea y consecuentemente la formación del follaje (Müller & Leyser, 2011; Su et al., 2011). Nuestros resultados indicaron que la señalización de las auxinas y etileno parece no ser tan importante para la formación del follaje debido a que las mutantes en el trasporte, percepción y señalización de las auxinas y etileno desarrollan hojas de manera similar a las plantas silvestres en los tres tipos de interacción (datos no mostrados). De manera interesante, *A. brasilense* fue incapaz de estimular el crecimiento y desarrollo del follaje en plantas mutadas en la familia de receptores AHKs que participan en la percepción de las citocininas en los tres tipos de interacción. Este resultado demuestra la importancia de las citocininas en la formación del follaje y es acorde a los estudios donde demuestran la importancia de los receptores AHKs en la formación del follaje ya sea de manera normal o en presencia de alguna rizobacteria (Higuchi et al., 2004; Ortíz-Castro et al., 2008; Riefler et al., 2006).

La participación de las fitohormonas fue más evidente en el sistema radicular. Actualmente es conocido que las auxinas, citocininas y etileno controlan la arquitectura del sistema radical, como la formación de las raíces laterales y pelos radiculares (Pitts et al., 1998; Higuchi et al., 2004; Li et al., 2006; Riefler et al., 2006; Laplaze et al., 2007; Fukaki et al., 2007; Dubrovsky et al., 2008; Ivanchenko et al., 2008; Ortíz-Castro et al., 2008; Alarcón et al., 2014; Bhattacharyya et al., 2015; Zhang et al., 2016; Wang et al., 2017). En los tres tipos de interacción, la formación

de las raíces laterales y pelos radiculares fue disminuida en mutantes de auxinas. Mientras que la bacteria estimuló la formación de raíces laterales en las mutantes de etileno. De manera interesante la elongación de los pelos radiculares se vio disminuido solo en la mutante *ein2.* Este resultado, es similar a lo reportado en plantas de tomate y de *Arabidopsis* inoculadas con *Azospirillum sp.* y *Pseudomona*s *sp*., respectivamente (Ribaudo et al., 2006; Zamioudis et al., 2013). Finalmente, la formación de raíces laterales y pelos radiculares solo se afectó en la triple mutante de la familia de receptores AHKs. Esto demuestra la participación redundante de los receptores (Werner et al., 2003; Higuchi et al., 2004; Nishimura et al., 2004; Müller & Leyser, 2011) de las citocininas en el desarrollo y crecimiento vegetal. Además, el papel de las citocininas junto con otras hormonas ha sido demostrado también en la promoción del crecimiento vegetal estimulado por otras rizobacterias (Gonzalez-rizzo et al., 2006; Ortíz-Castro et al., 2008; Bhattacharyya et al., 2015; Wang et al., 2017).

Estos resultados demuestran la compleja interacción de la señalización de las auxinas, citocininas y etileno en la promoción del crecimiento vegetal, independientemente del tipo de interacción.

Además de la señalización de las fitohormonas, existen otras rutas de señalización que controlan el crecimiento y desarrollo vegetal, tal es el caso de la señalización mediada por la proteína TOR, una proteína cinasa que controla la división y crecimiento celular en respuesta a nutrientes como la glucosa y a factores de crecimiento (Shi et al., 2018). Recientes estudios indican la interacción de las auxinas con la señalización de TOR para controlar la síntesis de proteínas y la división celular en el meristemo de la parte aérea y de la raíz (Li et al., 2017; Schepetilnikov et al., 2017). De acuerdo con nuestros resultados, *A. brasilense* promueve la formación del follaje, raíces laterales y pelos radiculares mediante la compleja interacción entre la señalización de auxinas, citocininas y etileno. Además, se ha demostrado que estos procesos estimulados por la bacteria son también controlados por la señalización de TOR (Xiong & Sheen, 2014).

Analizando la expresión de TOR en *A. thaliana* durante la interacción con *A. brasilense*, la expresión se localizó en los meristemos de la parte aérea y de la raíz, la cual gradualmente se disminuye hacia la zona de elongación de la raíz. La expresión de TOR, correlacionó con un incremento en la fosforilación de su blanco directo, la proteína S6K. La estimulación de la expresión y la actividad de TOR empezó 24 horas después de la inoculación, indicando que esta proteína no solo podría participar en la regulación del crecimiento estimulado por la bacteria, sino también en el establecimiento de la interacción. Esta idea es apoyada por un estudio reciente donde se demuestra que TOR participa en el establecimiento de la interacción entre rizobium-leguminosa, porque regula el desarrollo de los hilos de infección indispensables para la colonización y formación de nódulos (Nanjareddy et al., 2016). Además, también se ha mostrado que la alta expresión de TOR permite una mayor susceptibilidad y colonización de las plantas de arroz a hongos y bacterias patógenos (De Vleesschauwer et al., 2017).

Para analizar de manera adicional el papel de TOR en el crecimiento y desarrollo vegetal en respuesta a la inoculación con *A. brasilense*, se utilizó el inhibidor de TOR, AZD-8055. En presencia del inhibidor, se observó una reducción en el crecimiento vegetal y de la fosforilación de S6K, indicando la importancia de la proteína TOR durante la interacción. Curiosamente, aun en presencia del inhibidor, la bacteria estimulo ligeramente la formación de raíces laterales y pelos radiculares, posiblemente por la alta actividad de TOR o por la participación de una vía alterna a TOR. Esta estimulación se observa claramente en el meristemo de la raíz principal. Se ha reportado anteriormente que el inhibidor AZD-8055 reduce el tamaño del meristemo y la división celular (Montané & Menand, 2013). La rizobacteria indujo la diferenciación del meristemo y por lo tanto el número de células en división celular, y *A. brasilense* revirtió ligeramente la división celular en presencia del inhibidor. Esta respuesta fue contradictoria con la baja actividad de TOR, y es posible que la bacteria estimule otras vías para controlar la actividad meristemática. Se ha reportado que la proteína S6K promueve la síntesis de proteínas y además promueve o inhibe la división celular dependiendo del estímulo (Henriques et al., 2010, 2013; Shin et al., 2012). Así, se ha demostrado que S6K

reprime la división celular en presencia de altas concentraciones de auxinas, pero las promueve en presencia de estrés (Mahfouz, 2006; Henriques et al., 2010; Shin et al., 2012). La contribución de la proteína S6K no se ha determinado en interacciones planta microorganismo, y sería importante determinar si la división celular estimulada por las PGPR en el meristemo de la raíz principal es mediada por la proteína S6K.

La señalización TOR es estimulada por la luz, fitohormonas y glucosa (Xiong et al., 2013; Li et al., 2017). La luz estimula la fotosíntesis para producir glucosa y la biosíntesis del AIA, que conjuntamente promueven la actividad meristemática mediante la participación de ROP2 que fosforila y activa TOR (Li et al., 2017). Al perecer *A. brasilense*, estimula la expresión de TOR mediante la participación de las auxinas producidas por la bacteria, ya que la mutante FAJ0009 (que solo produce el 10% del AIA) no la estimuló de la misma manera que la cepa silvestre. Seria de interés conocer si la rizobacteria activa a la proteína TOR mediante la participación de ROP2, o por un mecanismo independiente. Es importante considerar que la proteína S6K que indica la actividad de TOR, no solo es activada por TOR, se ha sugerido que la proteína S6K es activada directamente por la fosfolipasa D (PLD), o en convergencia con TOR en respuesta a las auxinas (Bögre et al., 2013). Adicionalmente, las citocininas también activan TOR mediante un mecanismo poco conocido (Pfeiffer et al., 2016), y *A. brasilense* también produce esta fitohormona (Strzelczyk et al., 1994).

Además de las auxinas, los lipopolisacáridos (LPS) de *A. brasilense* promueven el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis*. Estas moléculas inducen la división y diferenciación celular en el meristemo de la raíz primaria y estimulan respuestas bioquímicas y aceleran el desarrollo y crecimiento de plantas de trigo (Evseeva et al., 2011; Vallejo-ochoa et al., 2017; Chávez et al., 2018). Además, se han implicado en las respuestas de defensa en plantas (Erbs & Newman, 2003). En nuestro estudio, observamos que estas moléculas también activan la expresión y la actividad de la proteína TOR. Este resultado abre un nuevo panorama de su estudio en plantas, y sería muy interesante determinar cómo los LPS la activan y cómo

regula el crecimiento en respuesta a los LPS. Recientemente se ha reportado que solo los LPS de *Pseudomonas* son reconocidos por el receptor conocido como LORE, presente en *Arabidopsis* (Ranf et al., 2015). La percepción de los LPS de *Azospirillum* por esta proteína no ha sido estudiada.

Por otro lado, *Azospirillum spp.,* promueve el crecimiento vegetal a través de la inducción de respuestas de defensa ante patógenos (Bashan & De-Bashan, 2002; Yasuda et al., 2009; Fukami et al., 2017). Recientemente, se ha encontrado que las respuestas de defensa ante patógenos de las plantas de trigo, son negativamente reguladas por TOR (De Vleesschauwer et al., 2017), y surge la duda de como regula la respuesta de defensa ante las rizobacterias que promueven el crecimiento vegetal. Además, *A. brasilense* mejora el crecimiento vegetal en condiciones de estrés abiótico, como déficit de agua y alta salinidad. El mecanismo usado por esta rizobacteria bajo estas condiciones implica la biosíntesis de la hormona de estrés, el ácido abscísico (ABA), por parte de la rizobacteria y de la planta (Cohen et al., 2008, 2015). Sin embargo, Wang et al., 2018, ha demostrado que TOR reprime la señalización de ABA y la respuesta a estrés en condiciones normales, mientras que la señalización de ABA reprime la señalización de TOR en condiciones de estrés.

Finalmente, los resultados muestran que la promoción del crecimiento vegetal en *A. thaliana* estimulado por *A. brasilense,* implica una compleja red de señalización compuesta por fitohormonas, LPS y TOR. Analizar como coordinan el crecimiento vegetal nos ayudaría a comprender muchos aspectos sobre la interacción planta-microorganismo.

14. LITERATURA CITADA

Ahn C. S., Ahn H., & Pai H. 2015. Overexpression of the PP2A regulatory subunit Tap46 leads to enhanced plant growth through stimulation of the TOR signalling pathway. *Journal of Experimental Botany*, *66*(3): 827–840. https://doi.org/10.1093/jxb/eru438

Ahn C. S., Han J., Lee H., Lee S., & Pai H. 2011. The PP2A regulatory subunit Tap46, a component of the TOR signaling pathway, modulates growth and metabolism in plants. *The Plant Cell*, *23(1)*: 185–209. https://doi.org/10.1105/tpc.110.074005

Aichinger E., Kornet N., Friedrich T., & Laux T. 2012. Plant stem cell niches. *Annual Review Plant Biology*, *63*: 615–636. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105555

Alarcón M. V., Lloret P. G., & Salguero J. 2014. Synergistic action of auxin and ethylene on root elongation inhibition is caused by a reduction of epidermal cell length. *Plant Signaling and Behavior*, *9(3)*: e28361. https://doi.org/10.4161/psb.28361

Amavizca E., Bashan Y., Ryu C., Farag M. A., & Bebout B. M. 2017. Enhanced performance of the microalga *Chlorella sorokiniana* remotely induced by the plant growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Bacillus pumilus*. *Scientific Reports*, 7: 41310. https://doi.org/10.1038/srep41310

Anderson G. H., Veit B., & Hanson M. R. 2005. The *Arabidopsis* AtRaptor genes are essential for post-embryonic plant growth. *BMC Biology*, *3*(1): 12. https://doi.org/10.1186/1741-7007-3-12

Backer R., Rokem J. S., Ilangumaran G., Lamont J., Praslickova D., Ricci E., Subramanian S., & Smith D. L. 2018. Plant growth-promoting rhizobacteria: Context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 1473. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473

Badri D. V, Weir T. L., Lelie D. Van Der, & Vivanco J. M. 2009. Rhizosphere chemical dialogues : plant–microbe interactions. *Current Opinion in Biotechnology*, *20(6)*: 642–650. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.09.014

Baena-González E., Rolland F., Thevelein J. M., & Sheen J. 2007. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature*, *448*: 938–942. https://doi.org/10.1038/nature06069

Baldani José I., & Baldani Vera L.D.. (2005). History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 77(3), 549-579. https://doi.org/10.1590/S0001-37652005000300014

Bashan Y., & De-Bashan L. 2010. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—A critical assessment. In *Advances in Agronomy* (1st ed., Vol. 108, Issue 10). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/S0065-2113(10)08002-8

Bashan Y., & De-Bashan L. E. 2002. Protection of tomato seedlings against Infection by *Pseudomonas syringae* pv. Tomato by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(6): 2637–2643. https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.2637

Bhattacharyya D., Garladinne M., & Lee Y. H. 2015. Volatile indole produced by rhizobacterium *Proteus vulgaris* JBLS202 stimulates growth of *Arabidopsis thaliana* through auxin, cytokinin, and brassinosteroid pathways. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34: 158–168. https://doi.org/10.1007/s00344-014-9453-x

Blenis J. 2017. TOR, the gateway to cellular metabolism, cell growth, and disease. *Cell*, *171*(1): 10–13. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.019

Blilou I., Xu J., Wildwater M., Willemsen V., Paponov I., Heidstra R., Aida M., Palme K., & Scheres B. 2005. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature*, *433*: 39–44

Bögre L., Henriques R., & Magyar Z. 2013. TOR tour to auxin. *The EMBO Journal*, *32*(8): 1069–1071. https://doi.org/10.1038/emboj.2013.69

Bottini R., Cassán F., & Piccoli P. 2004. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *65*(5): 497–503. https://doi.org/10.1007/s00253-004-1696-1

Broekaert W. F., Delauré S. L., De Bolle M. F. C., & Cammue B. P. A. 2006. The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology*, *44*(1): 393–416. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143440

Caldana C., Li Y., Leisse A., Zhang Y., Bartholomaeus L., Fernie A. R., Willmitzer, L., & Giavalisco, P. 2013. Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants reveal a general metabolic switch controlling growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, *73*(6): 897–909. https://doi.org/10.1111/tpj.12080

Cassan F., & Diaz-Zorita M. 2016. *Azospirillum sp*. in current agriculture: From the laboratory to the field. *Soil Biology and Biochemistry*, *103*: 117–130. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.08.020

Chávez E., Hernández, A. A., Elda E., Mercado C., & García E. 2018. Effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharides on wheat plant development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 37: 859-866. https://doi.org/10.1007/s00344-018-9782-2

Cohen A. C., Bottini R., & Piccoli P. N. 2008. *Azospirillum brasilense* Sp245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants. *Plant Growth Regulation*, *54*(2): 97–103. https://doi.org/10.1007/s10725-007-9232-9

Cohen A. C., Bottini R., Pontin M., Berli F. J., Moreno D., Boccanlandro H., Travaglia C. N., & Piccoli P. N. 2015. *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels. *Physiologia Plantarum*, *153*(1): 79–90. https://doi.org/10.1111/ppl.12221

Correa-Aragunde N., Graziano M., & Lamattina L. 2004. Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta*, *218*: 900–905. https://doi.org/10.1007/s00425-003-1172-7

Dello Ioio R., Linhares F. S., Scacchi E., Casamitjana-martinez E., Heidstra R., Costantino P., & Sabatini S. 2007. Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. *Current Biology*, *17(8)*: 678–682. https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.02.047

Dello Ioio R., Nakamura K., Moubayindin L., Perilli S., Taniguchi M., Morita T. M., Aoyama T., Costantino P., & Sabatini S. 2008. A genetic framework for genetic control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science*, 322(5906): 1543–1547. https://doi.org/10.1126/science.1164147

Deng K., Dong P., Wang W., Feng L., Xiong F., & Wang K. 2017. The TOR pathway is involved in adventitious root formation in *Arabidopsis* and potato. *Frontiers in Plant Science*, *8: 784*. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00784

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*. *Frontiers in Plant Science*, *7*: 291. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00291

Deprost D., Yao L., Sormani R., Moreau M., Leterreux G., Nicolaï M., Bedu M., Robaglia C., & Meyer C. 2007. The *Arabidopsis* TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Reports*, *8*(9): 864–870. https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401043

De Lucas M. De, & Brady S. M. 2013. Gene regulatory networks in the *Arabidopsis* root. *Current Opinion in Plant Biology*, *16*(1): 50–55. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.10.007

De Vleesschauwer D., Filipe O., Hoffman G., Seifi H. S., Haeck A., Canlas P., Van Bockhaven J., De Waele E., Demeestere K., Ronald P., & Hofte M. 2017. Target of rapamycin signaling orchestrates growth–defense trade-offs in plants. *New Phytologist*, 217(1): 305-319. https://doi.org/10.1111/nph.14785

Dobbelaere S., Croonenborghs A., Thys A., Vande-Broek A., & Vanderleyden J. 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil*, *212*: 153–169. https://doi.org/10.1023/A:1004658000815

Dodd I. C., Zinovkina N. Y., Safronova V. I., & Belimov A. A. 2010. Rhizobacterial mediation of plant hormone status. *Annals of Applied Biology*, *157*(3): 361–379. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2010.00439.x

Domingos P., Prado A. M., Wong A., Gehring C., & Feijo J. A. 2015. Nitric Oxide : A multitasked signaling gas in plants. *Molecular Plant*, 8(4): 506-520. https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.010

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

Dong Y., Silbermann M., Speiser A., Forieri I., Linster E., Poschet G., Samami A. A., Wanatabe M., Sticht C., Teleman A. A., Deragon J., Saito K., Hell R., & Wirtz M. 2017. Sulfur availability regulates plant growth via glucose-TOR signaling. *Nature Communications, 8(1): 1174*. https://doi.org/10.1038/s41467-017-01224-w

Dubois M., Broeck L. Van Den & Inzé D. 2018. The pivotal role of ethylene in plant growth. *Trends in Plant Science*, *23(4)*: 311-323. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.01.003

Dubrovsky J. G., Sauer M., Napsucialy-Mendivil S., Ivanchenko M. G., Friml J., Shishkova S., Celenza J., & Benkova E. 2008. Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(25): 8790–8794. https://doi.org/10.1073/pnas.0712307105

Erbs G., & Newman M. A. 2003. The role of lipopolysaccharides in induction of plant defence responses. *Molecular Plant Pathology*, *4*(5): 421–425. https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00179.x

Evseeva N. V, Matora L. Y., & Shchyogolev S. Y. 2011. Effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharide on the functional activity of wheat root meristematic cells. *Plant Soil*, 346: 181–188. https://doi.org/10.1007/s11104-011-0808-9

Ferreira F. J., & Kieber J. J. 2005. Cytokinin signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, *8(5)*: 518–525. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.07.013

Forzani C., Aichinger E., Sornay E., Willemsen V., Laux T., Dewitte W., & Murray J. A. H. 2014. WOX5 suppresses CYCLIN D activity to establish quiescence at the center of the root stem cell niche. *Current Biology*, *24*(16): 1939–1944. https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.07.019

Fukaki H., Okushima Y., & Tasaka M. 2007. Auxin mediated lateral root formation in higher plants. *International Review of Cytology*, *256*(07): 111–137. https://doi.org/10.1016/S0074-7696(07)56004-3

Fukami J., Ollero F. J., Megías M., & Hungria M. 2017. Phytohormones and induction of plant - stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. *AMB Express, 7: 153*. https://doi.org/10.1186/s13568-

017-0453-7

Gamalero E., & Glick B. R. 2015. Bacterial modulation of plant ethylene levels. *Plant Physiology*, *169(1)*: 13–22. https://doi.org/10.1104/pp.15.00284

Gonzalez-rizzo S., Crespi M., & Frugier F. 2006. The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *The Plant Cell*, *18(10)*: 2680–2693. https://doi.org/10.1105/tpc.106.043778

Hadas R., & Okon Y. 1987. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on root morphology and respiration in tomato seedlings. *Biology and Fertility of Soils*, *5*(3): 241–247. https://doi.org/10.1007/BF00256908

Harata K., Nishiuchi T., & Kubo Y. 2016. *Colletotrichum orbiculare* WHI2, a Yeast Stress-Response Regulator Homolog, controls the biotrophic stage of hemibiotrophic infection through TOR signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *29*(6): 468–483. https://doi.org/10.1094/MPMI-02-16-0030-R

Hartmann A., & Baldani J. I. 2006. The Genus *Azospirillum*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., & Stackebrandt E. (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1_6

Henriques R., Magyar Z., & Bögre L. 2013. S6K1 and E2FB are in mutually antagonistic regulatory links controlling cell growth and proliferation in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior*, *8*(6): e24367-1-e24367-5. https://doi.org/10.4161/psb.24367

Henriques R., Magyar Z., Monardes A., Khan S., Zalejski C., Orellana J., Szabados L., de la Torre C., Koncz C., & Bögre L. 2010. *Arabidopsis* S6 kinase mutants display chromosome instability and altered RBR1-E2F pathway activity. *The EMBO Journal*, *29*(17): 2979–2993. https://doi.org/10.1038/emboj.2010.164

Higuchi M., Pischke M. S., Mahonen A. P., Miyawaki K., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Shinozaki K., Kato T., Tabata S., Helariutta Y., Sussman M. R., & Kakimoto T. 2004. In planta functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 101*(23): 8821–8826. https://doi.org/10.1073/pnas.0402887101

Hutchison C. E., & Kieber J. J. 2002. Cytokinin signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 14(1): s47–s60. https://doi.org/10.1105/tpc.010444

Iqbal N., Khan N. A., Ferrante A., Trivellini A., Francini A., & Khan M. I. R. 2017. Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones. *Frontiers in Plant Science*, *8*: 475. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00475

Ivanchenko M. G., Muday G. K., & Dubrovsky J. G. 2008. Ethylene-auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, *55(2)*: 335–347. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03528.x

Ju C., & Chang C. 2015. Mechanistic insights in ethylene perception and signal transduction. *Plant Physiology*, *169*(1): 85–95. https://doi.org/10.1104/pp.15.00845

Khatabi B., & Schäfer P. 2012. Ethylene in mutualistic symbioses. *Plant Signaling & Behavior*, *7*(12): 1634–1638. https://doi.org/10.4161/psb.22471

Kieber J. J., & Schaller G. E. 2018. Cytokinin signaling in plant development. *Development*, *145*: dev149344. https://doi.org/10.1242/dev.149344

Kim J., & Guan K. 2019. mTOR as a central hub of nutrient signalling and cell growth. *Nature Cell Biology*, *21(1): 63-71*. https://doi.org/10.1038/s41556-018-0205-1

Korasick D. A., Enders T. A., & Strader L. C. 2013. Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany*, *64*(9): 2541–2555. https://doi.org/10.1093/jxb/ert080

Krämer U. 2015. THE NATURAL HISTORY OF MODEL ORGANISMS: Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *ELife*, 4: e06100. https://doi.org/10.7554/eLife.06100

Kravchenko A., Citerne S., Jéhanno I., Bersimbaev R. I., Veit B., Meyer C., & Leprince A. S. 2015. Mutations in the *Arabidopsis* Lst8 and Raptor genes encoding partners of the TOR complex, or inhibition of TOR activity decrease abscisic acid (ABA) synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *467*(4): 992–997. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.028

Kudoyarova G., Arkhipova T., Korshunova T., Bakaeva M., Loginov O., & Dodd I. C. 2019. Phytohormone mediation of interactions between plants and non-symbiotic growth promoting bacteria under edaphic stresses. *Frontiers in Plant Science*, *10*: 1368. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01368

Laplante M, & Sabatini D. M. 2009. mTOR signaling at a glance. *Journal Cell Science*, *122*(Pt 20): 3589–3594. https://doi.org/10.1242/jcs.051011

Laplante M., & Sabatini D. M. 2012a. mTOR Signaling. *Cold Spring Harbor Perspective in Biology*, *4(2)*: a011593. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011593

Laplante M., & Sabatini D. M. 2012b. MTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, *149*(2): 274–293. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017

Laplaze L., Benkova E., Casimiro I., Maes L., Vanneste S., Swarup R., Weijers D., Calvo V., Parizot B., Herrera-Rodriguez M. B., Offringa R., Graham N., Doumas P., Friml J., Bogusz D., Beeckman T., & Bennett M. 2007. Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root lnitiation. *The Plant Cell*, *19(12)*: 3889–3900. https://doi.org/10.1105/tpc.107.055863

Leyser O. 2018. Auxin signaling. *Plant Physiology*, *176(1)*: 465–479. https://doi.org/10.1104/pp.17.00765

Li Q., Saleh-Lakha S., & Glick B. R. 2005. The effect of native and ACC deaminase-containing *Azospirillum brasilense* Cd1843 on the rooting of carnation cuttings. *Canadian Journal of Microbiology*, 51(6): 511-514. https://doi.org/10.1139/w05-027

Li X, Mo X., Shou H., & Wu P. 2006. Cytokinin-mediated cell cycling arrest of pericycle founder cells in lateral root initiation of *Arabidopsis*. *Plant & Cell Physiology*, *47*(8): 1112–1123. https://doi.org/10.1093/pcp/pcj082

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 apexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(10): 2765–2770. https://doi.org/10.1073/pnas.1618782114

Ljung K., Bhalerao R. P., & Sandberg G. 2001. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *The Plant Journal*, *28*(4): 465–474. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.01173.x

Loewith R., Jacinto E., Wullschleger S., Lorberg A., Crespo J. L., Bonenfant D., Oppliger W., Jenoe P., & Hall M. N. 2002. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Molecular Cell*, *10*(3): 457–468. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00636-6

López-Berges M. S., Rispail N., Prados-Rosales R. C., & Di Pietro A. 2010. A nitrogen response pathway regulates virulence functions in Fusarium oxysporum via the protein kinase TOR and the bZIP protein MeaB. *The Plant Cell*, *22*(7): 2459–2475. https://doi.org/10.1105/tpc.110.075937

López-Bucio J., Campos-Cuevas J. C., Hernández-Calderón E., Velásquez-Becerra C., Farías-Rodríguez R., Macías-Rodríguez L. I., & Valencia-Cantero E. 2007. *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin- and ethylene-

independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions, 20*(2): 207–217. https://doi.org/10.1094/MPMI-20-2-0207

Lopez-Bucio J., Millan-Godinez M., Mendez-Bravo A., Morquecho-Contreras A., Ramirez-Chavez E., Molina-Torres J., Perez-Torres A., Higuchi, M., Kakimoto, T., & Herrera-Estrella L. 2007a. Cytokinin receptors are involved in alkamide regulation of root and shoot development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *145*(4); 1703–1713. https://doi.org/10.1104/pp.107.107953

Lugtenberg B., & Kamilova F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review Microbiology*, *63*: 541–556. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918

Mahfouz M. M. 2006. *Arabidopsis* TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *The Plant Cell*, *18*(2): 477–490. https://doi.org/10.1105/tpc.105.035931

Mano Y., & Nemoto K. 2012. The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany*, *63*(8): 2853–2872. https://doi.org/10.1093/jxb/ers091

Marroquin-Guzman M., Sun G., & Wilson R. A. 2017. Glucose- ABL1 -TOR signaling modulates cell cycle tuning to control terminal appressorial cell differentiation. *PLOS Genetics*, *13*(1): e1006557. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006557

Marshall R. S., & Vierstra R. D. 2018. Autophagy: The master of bulk and selective recycling. *Annual Review of Plant Biology*, *69*: 173–208. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040606

Masucci J. D., & Schiefelbein J. W. 1994. The rhd6 mutation of *Arabidopsis thaliana* alters root-hair initiation through an auxin- and ethylene-associated process. *Plant physiology*, 101(4): 1335–1346. https://doi.org/10.1104/pp.106.4.1335

Menand B., Desnos T., Nussaume L., Berger F., Bouchez D., Meyer C., & Robaglia C. 2002. Expression and disruption of the *Arabidopsis* TOR (target of rapamycin) gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(9): 6422–6427. https://doi.org/10.1073/pnas.092141899

Mendes R., Garbeva P., & Raaijmakers J. M. 2017. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, *37(5)*: 634–663. https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028

Michaeli S., Galili G., Genschik P., Fernie A. R., & Avin-Wittenberg T. 2016. Autophagy in plants - what's new on the menu?. *Trends in Plant Science*, *21*(2): 134–144. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.10.008

Molina-favero C., Creus C. M., Simontacchi M., Puntarulo S., & Lamattina L. 2008. Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *21*(7): 1001–1009. https://doi.org/10.1094/MPMI-21-7-1001

Montané M. H., & Menand B. 2013. ATP-competitive mTOR kinase inhibitors delay plant growth by triggering early differentiation of meristematic cells but no developmental patterning change. *Journal of Experimental Botany*, *64*(14): 4361–4374. https://doi.org/10.1093/jxb/ert242

Moreau M., Azzopardi M., Cle G., Renne C., Taconnat L., Renou J., Robaglia C., & Meyer C. 2012. Mutations in the *Arabidopsis* homolog of LST8/GbL, a partner of the Target of Rapamycin Kinase, impair plant growth, flowering, and metabolic adaptation to long days. *The Plant Cell*, *24(2)*: 463–481. https://doi.org/10.1105/tpc.111.091306

Moubayidin L., Mambro R. Di, Sozzani R., Pacifici E., Salvi E., Terpstra I., Bao D., Van Dijken A., Dello Ioio R., Perilli S., Ljung K., Benfey P. N., Heidstra R., Costantino P., & Sabatini S. 2013. Spatial coordination between stem cell activity and cell differentiation in the root meristem. *Developmental Cell*, *26(4)*: 405–415. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.06.025

Müller D. B., Vogel C., Bai Y., & Vorholt J. A. 2016. The plant microbiota: systems-level insights and

perspectives. *Annual Review of Genetics*, *50*: 211–234. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-034952

Müller D., & Leyser O. 2011. Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. *Annals of Botany*, *107(7)*: 1203–1212. https://doi.org/10.1093/aob/mcr069

Nanjareddy K., Blanco L., Arthikala M., Alvarado-affantranger X., Quinto C., Sánchez F., & Lara M. 2016. A legume TOR protein kinase regulates *Rhizobium Symbiosis* and is essential for infection and nodule development. *Plant Physiology*, *172(3)*: 2002–2020. https://doi.org/10.1104/pp.16.00844

Nascimiento F. X., Rossi M. J., Soares C. R. F. S., McConkey B. J., Glick B. R. 2014. New Insights into 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) Deaminase Phylogeny, Evolution and Ecological Significance. *PLOS ONE*, 9(6): e99168. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099168

Nishimura C., Ohashi Y., Sato S., Kato T., Tabata S., & Ueguchi C. 2004. Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16(6): 1365-1377. https://doi.org/10.1105/tpc.021477

Nukarinen E., Nägele T., Pedrotti L., Wurzinger B., Baena-gonzalez E., Dröge-laser W., & Weckwerth W. 2016. Quantitative phosphoproteomics reveals the role of the AMPK plant ortholog SnRK1 as a metabolic master regulator under energy deprivation. *Scientific Reports*, 6: 31697. https://doi.org/10.1038/srep31697

Okon Y., Heytler P. G., & Hardy R. W. 1983. N2 Fixation by *Azospirillum brasilense* and its incorporation into host *Setaria italica*. *Applied and Environmental Microbiology*, *46*(3): 694–697

Orozco-Mosqueda M. C., Glick B. R., Santoyo G., 2020. ACC deaminase in plant growth-promoting bacteria (PGPB): An efficient mechanism to counter salt stress in crops. *Microbiological Research*, 235: 126439. https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126439

Ortíz-Castro R., Valencia-Cantero E., & López-Bucio,J. 2008. Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. *Plant Signaling and Behavior*, *3*(4): 263–265. https://doi.org/10.4161/psb.3.4.5204

Overvoorde P., Fukaki H., & Beeckman T. 2010. Auxin control of root development. *Cold Spring Harb Perspectives in Biology*, 2(6): a001537. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001537

Patriquin D. G., Döbereiner J., & Jain D. K. 1983. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. *Canadian Journal of Microbiology*, *29*(8): 900–915. https://doi.org/10.1139/m83-146

Petrasek J., & Friml J. 2009. Auxin transport routes in plant development. *Development*, *136*(16): 2675–2688. https://doi.org/10.1242/dev.030353

Petricka J. J., Winter C. M., & Benfey P. N. 2012. Control of *Arabidopsis* root development. *Annual Review of Plant Biology*, *63*: 563–590. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105501

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

Philippot L., Raaijmakers J. M., Lemanceau P., & Van Der Putten W. H. 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, *11*: 789–799. https://doi.org/10.1038/nrmicro3109

Pierik R., Sasidharan R., & Voesenek L. A. C. J. 2007. Growth control by ethylene: Adjusting phenotypes to the environment. *Journal of Plant Growth Regulation*, *26*(2): 188–200. https://doi.org/10.1007/s00344-006-0124-4

Pitts R. J., Cernac A., & Estelle M. 1998. Auxin and ethylene promote root hair elongation in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, *16*(5): 553–560. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00321.x

Popa C., Li L., Gil S., Tatjer L., Hashii K., Tabuchi M., Coll N. S., Ariño J., & Valls M. 2016. The effector AWR5 from the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* is an inhibitor of the TOR signalling pathway. *Scientific Reports*, *6*: 27058. https://doi.org/10.1038/srep27058

Ranf S., Gisch N., Schäffer M., Illig T., Westphal L., Knirel Y. A., Sánchez-Carballo P. M., Zähringer U., Hückelhoven R., Lee J., & Scheel D. 2015. A lectin S-domain receptor kinase mediates lipopolysaccharide sensing in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Immunology*, *16*(4): 426–433. https://doi.org/10.1038/ni.3124

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 Physiology*, *155*(3): 1367–1382. https://doi.org/10.1104/pp.110.169045

Ren M., Venglat P., Qiu S., Feng L., Cao Y., Wang E., Xiang D., Wang J., Alexander D., Chalivendra S., Logan D., Mattoo A., Selvaraj G., & Datla R. 2012. Target of rapamycin signaling regulates metabolism, growth, and life span in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *24*(12): 4850–4874. https://doi.org/10.1105/tpc.112.107144

Rexin D., Meyer C., Robaglia C., & Veit B. 2015. TOR signalling in plants. *Biochemical Journal*, *470*(1): 1–14. https://doi.org/10.1042/BJ20150505

Ribaudo C. M., Krumpholz E. M., Cassa F. D., Bottini R., Cantore L. M. & Cura A. J. 2006. *Azospirillum sp*. promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. *Journal Plant Growth Regulation*, *25:* 175–185. https://doi.org/10.1007/s00344-005-0128-5

Riefler M., Novak O., Strnad M., & Schmüllimg T. 2006. *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *The Plant Cell*, *18(1)*: 40–54. https://doi.org/10.1105/tpc.105.037796

Roustan V., Jain A., Teige M., Ebersberger I., & Weckwerth W. 2016. An evolutionary perspective of AMPK-TOR signaling in the three domains of life. *Journal of Experimental Botany*, 67(13): 3897-3907. https://doi.org/10.1093/jxb/erw211

Ruzicka K., Ljung K., Vanneste S., Podhorska R., Beeckman T., Friml J., & Benková E. 2007. Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *The Plant Cell*, *19*(7): 2197–2212. https://doi.org/10.1105/tpc.107.052126

Ryu C. M., Farag M. A., Hu C. H., Reddy M. S., Wei H. X., Pare P. W., & Kloepper J. W. 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(8): 4927–4932. https://doi.org/10.1073/pnas.0730845100

Sabatini D. M. 2017. Twenty-five years of mTOR: Uncovering the link from nutrients to growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(45): 11818–11825. https://doi.org/10.1073/pnas.1716173114

Saharan B. S., & Nehra V. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research*, *21*(1): 1-30

Sakakibara H. 2005. Cytokinin biosynthesis and regulation. In G. Litwack (Ed.), *Plant Hormones* (1st Editio, Vol. 72, Issue 05, pp. 271–287). Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0083-6729(05)72008-2

Salehin M., Bagchi R., & Estelle M. 2015. SCFTIR1/AFB-based auxin perception: mechanism and role in plant growth and development. *The Plant Cell*, *27*(1): 9–19. https://doi.org/10.1105/tpc.114.133744

Salem M. A., & Giavalisco P. 2019. Mutation in the *Arabidopsis* regulatory-associated protein TOR

1B (RAPTOR1B) leads to decreased jasmonates levels in leaf tissue. *Plant Signaling & Behavior*, 14(10): e1649567. https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1649567

Santner A., Calderon-villalobos L. I. A., & Estelle M. 2009. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology*, *5*(5): 301–307. https://doi.org/10.1038/nchembio.165

Sarkar A. K., Luijten M., Miyashima S., Lenhard M., Hashimoto T., Nakajima K., Scheres B., Heidstra R., & Laux T. 2007. Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature*, *446*: 811–814. https://doi.org/10.1038/nature05703

Saxton R. A., & Sabatini D. M. 2017. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell*, *168*(6): 960–976. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004

Schaller G. E., Bishopp A., & Kieber J. J. 2015. The yin-yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development. *The Plant Cell*, *27*(1): 44–63. https://doi.org/10.1105/tpc.114.133595

Schepetilnikov M., Dimitrova M., Mancera-Martínez E., Geldreich A., Keller M., & Ryabova L. A. 2013. TOR and S6K1 promote translation reinitiation of uORF-containing mRNAs via phosphorylation of eIF3h. *The EMBO Journal*, *32*(8): 1087–1102. https://doi.org/10.1038/emboj.2013.61

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

Schepetilnikov M., Makarian J., Srour O., Geldreich A., Yang Z., Hammann P., & Ryabova L. A. 2017. GTPase ROP2 binds and promotes activation of target of rapamycin, TOR, in response to auxin. *The EMBO Journal*, 36(7): 886-903. https://doi.org/10.15252/embj.201694816

Schepetilnikov M., & Ryabova L. A. 2017. Auxin signaling in regulation of plant translation reinitiation. *Frontiers in Plant Science*, *8*: 1014. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01014

Schepetilnikov M., & Ryabova L. A. 2018. Recent discoveries on the role of tor (Target of rapamycin) signaling in translation in plants. *Plant Physiology*, *176*(2): 1095–1105. https://doi.org/10.1104/pp.17.01243

Serfontein J., Nisbet R. E. R., Howe C. J., & De Vries P. J. 2010. Evolution of the TSC1 / TSC2-TOR signaling pathway. *Science Signaling*, *3*(128): ra49. https://doi.org/10.1126/scisignal.2000803

Shi L., W, Y., & Sheen J. 2018. TOR signaling in plants: conservation and innovation. *Development*, *145*: dev160887. https://doi.org/10.1242/dev.160887

Shimobayashi M., & Hall M. N. 2014. Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nature Reviews Molecular Cell Biology, 15*(3): 155–162. https://doi.org/10.1038/nrm3757

Shin Y., Kim S., Du H., Choi S., & Verma D. P. S. 2012. Possible dual regulatory circuits involving AtS6K1 in the regulation of plant cell cycle and growth. *Molecules and Cells*, *33(5)*: 487–496. https://doi.org/10.1007/s10059-012-2275-4

Silhavy T. J., Kahne D., & Walker S. 2010. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspective in Biology*, *2(5)*: a000414. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414

Somers E., Ptacek D., Gysegom P., Srinivasan M., & Vanderleyden J. 2005. *Azospirillum brasilense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(4): 1803–1810. https://doi.org/ 10.1128/AEM.71.4.1803-1810.2005

Song Y., Zhao G., Zhang X., Li L., Xiong F., Zhuo F., Zhang C., Yang Z., Datla R., Ren M., & Li F. 2017. The crosstalk between Target of Rapamycin (TOR) and Jasmonic Acid (JA) signaling

existing in *Arabidopsis* and cotton. *Scientific Reports*, *7*: 45830. https://doi.org/10.1038/srep45830

Soto-burgos J., & Bassham D. C. 2017. SnRK1 activates autophagy via the TOR signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, *12*(8): e0182591. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182591

Spaepen S., Bossuyt S., Engelen K., Marchal K., & Vanderleyden J. 2014. Phenotypical and molecular responses of *Arabidopsis thaliana* roots as a result of inoculation with the auxin-producing bacterium *Azospirillum brasilense*. *New Phytologist*, *201*(3): 850–861. https://doi.org/10.1111/nph.12590

Spaepen S., Dobbelaere S., Croonenborghs A., & Vanderleyden J. 2008. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant and Soil*, *312*: 15–23. https://doi.org/10.1007/s11104-008-9560-1

Spaepen S., & Vanderleyden J. 2011. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(4): a001438. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001438

Steenhoudt O., & Vanderleyden J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: Genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, *24*(4): 487–506. https://doi.org/10.1016/S0168-6445(00)00036-X

Strader L. C., & Zhao Y. 2016. Auxin perception and downstream events. *Current Opinion in Plant Biology*, *33*: 8–14. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.04.004

Strzelczyk E., Kampert M., & Li C. Y. 1994. Cytokinin-like substances and ethylene production by Azospirillum in media with different carbon sources. *Microbiological Research*, *149(1)*: 55–60. https://doi.org/10.1016/S0944-5013(11)80136-9

Su Y. H., Liu Y. B., & Zhang X. S. 2011. Auxin–Cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular Plant*, *4*(4): 616–625. https://doi.org/10.1093/mp/ssr007

Taiz L., & Zeiger E. 2003. Plant Physiology. In *Sinauer Associates* (3rd ed.). https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004

Tarrand J. J., Krieg N. R., & Döbereiner J. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense sp*. nov. *Canadian Journal of Microbiology*, *24(8)*: 967–980. https://doi.org/10.1139/m78-160

The Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, *408: 796-815*. https://doi.org/10.1038/35048692

Tien T. M., Gaskins M. H., & Hubbell D. H. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L .). *Applied and Environmental Microbiology*, *37*(5): 1016–1024

Tortora M. L., Díaz-Ricci J. C., & Pedraza R. O. 2011. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Archives of Microbiology*, *193*(4): 275–286. https://doi.org/10.1007/s00203-010-0672-7

Vacheron J., Desbrosses G., Bouffaud M.-L., Touraine B., Moënne-Loccoz Y., Muller D., Legendre L., Wisniewski-Dyé F., & Prigent-Combaret C. 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, *4*: 356. https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00356

Vallejo-ochoa J., López-marmolejo M., Hernández-esquivel A. A., Méndez-gómez M., Suárez-soria L. N., Castro-mercado E., & García-pineda E. 2017. Early plant growth and biochemical responses induced by *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharides in wheat (Triticum aestivum L.) seedlings are attenuated by procyanidin B2. *Protoplasma*, 255: 685–694.

https://doi.org/10.1007/s00709-017-1180-2

Van Dam T. J. P., Zwartkruis F. J. T., Bos J. L., & Snel B. 2011. Evolution of the TOR pathway. *Journal of Molecular Evolution*, *73*(3–4): 209–220. https://doi.org/10.1007/s00239-011-9469-9

Van Loon L. C., Rep M., & Pieterse C. M. J. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review Phytopathology*, *44*: 135–162. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425

Van-Norman J. M., & Benfey P. N. 2009. *Arabidopsis thaliana* as a model organism in systems biology. *WIREs Systems Biology and Medicine*, 1(3): 372-379. https://doi.org/10.1002/wsbm.25

Vande Broek A., Lambrecht M., Eggermont K., & Vanderleyden J. 1999. Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology*, *181*(4): 1338–1342. https://doi.org/10.1128/JB.181.4.1338-1342.1999

Vandenbussche F., & Van Der Straeten D. 2012. The role of ethylene in plant growth and development. In M. T. McManus (Ed.), *The Plant Hormone Ethylene* (Vol. 44, pp. 219–241). Blackwell. https://doi.org/10.1002/9781118223086.ch9

Vanneste S., & Friml J. 2009. Auxin: A trigger for change in plant development. *Cell*, *136*(6): 1005–1016. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.001

Vernoux T., Besnard F., & Traas J. 2010. Auxin at the shoot apical meristem. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(4): a001487. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001487

Wang J., Zhang Y., Jin J., Li Q., Zhao C., Nan W., Wang X., Ma R., & Bi Y. 2017. An intact cytokinin-signaling pathway is required for *Bacillus sp*. LZR216-promoted plant growth and root system architecture altereation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Growth Regulation*, *84*(3): 507–518. https://doi.org/10.1007/s10725-017-0357-1

Wang K. L. C., Li H., & Ecker J. R. 2002. Ethylene biosynthesis and signaling networks. The *Plant Cell*, *14(S1):* S131–S152. https://doi.org/10.1105/tpc.001768

Wang P., Zhao Y., Li Z., Tao W. A., Hsu C., Liu X., Fu L., Hou Y., Du Y., Xie S., Zang C., Gao J., Cao M., Huang X., Zhu Y., Wang X., Tao W. A., Xing Y., & Zhu J. K. 2018. Reciprocal regulation of the TOR kinase and ABA receptor balances plant growth and stress response. *Molecular Cell*, *69(1)*: 100–112. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.12.002

Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Van Onckelen H., & Schmülling T. 2003. Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *The Plant Cell*, *15(11)*: 2532–2550. https://doi.org/10.1105/tpc.014928

Werner T., & Schmülling T. 2009. Cytokinin action in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, *12(5)*: 527–538. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.07.002

Williams M. E. 2010. Introduction to phytohormones. *The Plant Cell*, *22*(3): tpc.110.tt0310. https://doi.org/10.1105/tpc.110.tt0310

WOODWARD A. W., & BARTEL B. 2005. Auxin: Regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*, *95(5)*: 707–735. https://doi.org/10.1093/aob/mci083

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

Xiong F., Zhang R., Meng Z., Deng K., Que Y., Zhuo F., Feng L., Guo S., Datla R., & Ren M. 2016. Brassinosteriod Insensitive 2 (BIN2) acts as a downstream effector of the Target of Rapamycin (TOR) signaling pathway to regulate photoautotrophic growth in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, *213*(1): 233–249. https://doi.org/10.1111/nph.14118

Xiong Y., McCormack M., Li L., Hall Q., Xiang C., & Sheen J. 2013. Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature*, *496*(7444): 181–186. https://doi.org/10.1038/nature12030

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

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

Xiong Y., & Sheen J. 2014. The role of target of rapamycin signaling networks in plant growth and metabolism. *Plant Physiology*, *164*(2): 499–512. https://doi.org/10.1104/pp.113.229948

Xiong Y., & Sheen J. 2015. Novel links in the plant TOR kinase signaling network. *Current Opinion in Plant Biology*, *28*: 83–91. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.09.006

Yang C., Lu X., Ma B., Chen S., & Zhang J. 2015. Ethylene signaling in rice and *Arabidopsis*: Conserved and diverged aspects. *Molecular Plant*, *8*(4): 495–505. https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.01.003

Yang H., Rudge D. G., Koos J. D., Vaidialingam B., Yang H. J., & Pavletich N. P. 2013. mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature*, *497*(7448): 217–223. https://doi.org/10.1038/nature12122

Yasuda M., Isawa T., Shinozaki S., Minamisawa K., & Nakashita H. 2009. Effects of colonization of a bacterial endophyte, *Azospirillum sp*. B510, on disease resistance in rice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *73*(12): 2595–2599. https://doi.org/10.1271/bbb.90402

Yu F., Gu Q., Yun Y., Yin Y., Xu J. R., Shim W. B., & Ma Z. 2014. The TOR signaling pathway regulates vegetative development and virulence in *Fusarium graminearum*. *New Phytologist*, *203*(1): 219–232. https://doi.org/10.1111/nph.12776

Zamioudis C., Mastranesti P., Dhonukshe P., Blilou I., & Pieterse C. M. J. 2013. Unraveling root developmental programs initiated by beneficial *Pseudomonas spp*. bacteria. *Plant Physiology*, *162(1)*: 304–318. https://doi.org/10.1104/pp.112.212597

Zhang S., Huang L., Yan A., Liu Y., Liu B., Yu C., & Zhang A. 2016. Multiple phytohormones promote root hair elongation by regulating a similar set of genes in the root epidermis in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, *67*(22): 6363–6372. https://doi.org/10.1093/jxb/erw400

Zhang Z., Zhu J., Roh J., Marchive C., Kim S. K., Meyer C., Sun Y., Wang W., Wang Z. Y. 2016. TOR Signaling Promotes Accumulation of BZR1 to Balance Growth with Carbon Availability in *Arabidopsis*. *Current Biology*, *26(14)*: 1854–1860. https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.05.005

Zhao Y. 2010. Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual Review of Plant Biology*, *61*: 49–64. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112308

Protoplasma (2018) 255:685–694
https://doi.org/10.1007/s00709-017-1180-2

ORIGINAL ARTICLE

Early plant growth and biochemical responses induced by *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharides in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings are attenuated by procyanidin B2

Juan Vallejo-Ochoa[1] · Mariel López-Marmolejo[1] · Alma Alejandra Hernández-Esquivel[1] · Manuel Méndez-Gómez[1] · Laura Nicolasa Suárez-Soria[1] · Elda Castro-Mercado[1] · Ernesto García-Pineda[1]

Received: 8 June 2017 / Accepted: 26 October 2017 / Published online: 6 November 2017
© Springer-Verlag GmbH Austria 2017

Abstract This study analyzes the effects of procyanidin B2 on early wheat plant growth and plant biochemical responses promoted by lipopolysaccharides (LPS) derived from the rhizobacteria *Azospirillum brasilense* Sp245. Measurements of leaf, root length, fresh weight, and dry weight showed in vitro plant growth stimulation 4 days after treatment with *A. brasilense* as well as LPS. Superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) levels increased in seedling roots treated with LPS (100 μg mL^{-1}). The chlorophyll content in leaf decreased while the starch content increased 24 h after treatment in seedling roots. The LPS treatment induced a high increase in total peroxidase (POX) (EC 1.11.1.7) activity and ionically bound cell wall POX content in roots, when compared to respective controls. Early plant growth and biochemical responses observed in wheat seedlings treated with LPS were inhibited by the addition of procyanidin B2 (5 μg mL^{-1}), a B type proanthocyanidin (PAC), plant-derived polyphenolic compound with binding properties of LPS. All results suggest first that the ionically bound cell wall POX enzymes could be a molecular target of *A. brasilense* LPS, and second that the recognition or association of LPS by plant cells is required to activate plant responses. This last event could play a critical role during plant growth regulation by *A. brasilense* LPS.

Handling Editor: Néstor Carrillo

✉ Ernesto García-Pineda
egpineda@umich.mx

[1] Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, Edificio A1´, 58040 Morelia, Michoacan, Mexico

Keywords *Azospirillum brasilense* · Lipopolysaccharides · Proanthocyanidins · Peroxidase · Cell wall · Wheat · Reactive oxygen species

Introduction

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are free-living micro-organisms that exert beneficial effects on plants by colonizing the plant rhizosphere (Bashan and de-Bashan 2005). It has been reported that PGPR inoculating can result in increased germination, seedling emergence, and changes in the growth and yield of various horticultural crops (Esitken 2011).

Bacteria of genus *Azospirillum* (alpha-subclass of proteobacteria) are Gram-negative free-living nitrogen-fixing bacteria that are also PGPR of cereals and grasses (Okon 1994; Okon and Vanderleyden 1997). Inoculation with *Azospirillum* significantly alters plant root morphology, an effect that is most likely a response to bacterial production of plant growth-regulating substances, such as auxin and gibberelins (Fibach-Paldi et al. 2012). Treating plants with *Azospirillum* increases the number of lateral roots and enlarges root hairs to maximize the surface area that is available for nutrient absorption. Consequently, these effects lead to a greater capacity for nutrient uptake and improved water status, which may be significant factors that contribute to the plant growth-promoting bioactivity (Okon 1994; Lin et al. 1983). Many bacterial cell components play important roles to establish an appropriate interaction with plant roots, one of such components are the lipolysaccharides (LPS).

LPS are cell surface components of Gram-negative bacteria that are associated with the outer membrane of the cell envelope. LPS are tri-partite molecules that consist of a lipid A, a

core oligosaccharide, and an O-polysaccharide moiety. These molecules play various important roles in interactions between bacterial pathogens and eukaryotic hosts (Erbs and Newman 2003), for example, LPS have been implicated in the virulence of many Gram-negative pathogens, and thus represent key molecules that can mediate host–microbe associations (Munford 2008).

LPS are recognized by specific host cell membrane components. In animal cells, Toll-like receptor 4 (TLR4) has been established as the LPS signaling receptor based on genetic evidence (Poltorak et al. 1998). TLR4 belong to TLR receptors which are a family of pattern recognition receptors that are classified on the basis of homology of the cytoplasmic domain with that of the interleukin-1 receptor (IL-1R) family, which is known as the Toll/IL-1R (TIR) domain (Slack et al. 2000). Twelve TLRs have been identified in mice (Tabeta et al. 2004) and 10 TLRs in humans (Chuang and Ulevitch 2000; Chuang and Ulevitch, 2001; Du et al. 2000). LPS-binding protein (LBP) is the first host protein involved in the recognition of LPS (Schumann et al. 1990). The role of this protein is to bring LPS to the cell surface by binding to LPS and forming a ternary complex with CD14, the LPS receptor molecule (Schumann et al. 1990), facilitating the transfer of LPS to the LPS receptor complex composed of TLR4 and MD2 (da Silva Correia et al. 2001). In plants, the presence of these LPS receptors actually is unknown.

In plants, LPS from various plant pathogenic bacteria also have been shown to act as microbe-associated molecular pattern (MAMP) molecules that can trigger plant innate immune responses (Erbs and Newman 2012). Additionally, LPS isolated from nonpathogenic PGPR have been shown to trigger induced systemic resistance in plants (ISR) (Van Loon et al. 1998; Coventry and Dubery 2001), along with the induction of rapid Ca^{2+} influx into the cytoplasm (Gerber et al. 2004) and the priming of plants to respond more rapidly and/or strongly to subsequent pathogen challenge (Nürnberger and Brunner 2002; Erbs and Newman 2003). The effect of LPS from rhizobacteria on plant growth and related biochemical responses has not been reported, even though it is well acknowledged that these molecules coat the surface of rhizobacteria and are important during the colonization of plant roots.

Proanthocyanidins (PACs) are natural phenolic compounds with a widespread occurrence throughout the plant kingdom (Lipson et al. 2007; Weiss et al. 2005) with properties to inhibit the microbial adhesion (Johnson-White et al. 2006; Greenberg et al. 2005). The interaction of PACs with lipopolysaccharide has been described. PACs specifically bound and neutralized the endocytosis of LPS by blocking its interaction with cognate LPS receptors (Delehanty et al. 2007). Studying the modulation of biochemical responses by PACs in plants activated by LPS may shed some light on the activity of these compounds as signaling molecules.

Biochemical plant responses activated by LPS include enzymes such as peroxidase (POX) and the production of reactive oxygen species (ROS) (Dow et al. 2000). POX are heme enzymes found in bacteria, fungi, plants, and animals, which exploit the reduction of H_2O_2 to catalyze oxidative reactions by taking electrons to various donor molecules, such as phenolic compounds, lignin precursors, auxin, or secondary metabolites (Dunford 1999; Hiraga et al. 2001; Veitch and Smith 2001; Passardi et al. 2004b). They are involved in different tissue-specific functions, such as the removal of H_2O_2 from chloroplasts and cytosol, oxidation of toxic compounds, biosynthesis of cell walls, wound repair, and catabolism of indole-3-acetic acid (Dunford 1999; Everse and Everse 1991; Veitch and Smith 2001). POX activity also can result in the cessation of cell elongation because cell wall structural proteins, extensins, and ferulic acid residues may be the targets of peroxidases that cause crosslink formation and cell wall stiffening (Brownleader et al. 2000; Fry, 1998). In contrast, in presence of NADH and H_2O_2, these enzymes produce the most powerful radical, the hydroxyl radical (·OH), which in turn can cause cell wall loosening and promote cell elongation (Liszkay et al. 2004). Therefore, POX can be considered bifunctional enzymes that oxidize various substrates in the presence of H_2O_2, but also produce ROS (Passardi et al. 2004b).

There is little information regarding the molecular mechanism by which LPS from *A. brasilense* stimulate biochemical responses related with plant growth. In this study, we analyzed PAC neutralization on *A. brasilense* LPS and its impact on the biochemical responses related with plant defense and plant growth as a strategy to elucidate the mechanism of action and biological activity of LPS in plants.

Materials and methods

Biological material

Wild-type *A. brasilense* Sp245 (Baldani et al. 1986) was used in this study. Bacteria were routinely grown on LB medium (10 g L^{-1} tryptone, 5 g L^{-1} yeast extract, 5 g L^{-1} NaCl, 0.186 g L^{-1} $MgSO_4$, 0.277 g L^{-1} $CaCl_2$, 15 g L^{-1} agar) and maintained in nutrient broth with 15% glycerol at − 80 °C for long-term storage. Cultures were grown for 20 h (i.e., exponential phase) at 27 °C with shaking at 100 rpm. To obtain bacteria for inocula, cultures were washed twice in 0.9% NaCl by centrifugation (4300×*g*, 10 min, 4 °C), resuspended in sterile water, and adjusted to 1×10^6 colony-forming units (CFU) mL^{-1}.

T. aestivum seeds, cv Nana F2007, were kindly provided by Dr. Mario González–Chavira (INIFAP-Celaya, Gto, México). Seeds were washed by shaking in 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) for 3 min, surface sterilized for 5 min with 1% sodium

hypochlorite solution, washed four times with sterile distilled water, and germinated on distilled water-wetted sterile filter paper in Petri dishes for 3 days in the dark at 28 °C.

Extraction of bacterial lipopolysaccharides

LPS extraction was performed by a modified procedure described by Leeman et al. (1995) and Renukadevi et al. (2012). *A. brasilense* cell wall fractions were isolated from 50-mL cultures grown for 16 h in LB agar (28 °C). The bacterial suspension was mixed with 90% phenol previously heated at 65 °C and incubated at 35 °C in an orbital shaker, at 160 rpm, for 15 min. The mixture was then incubated at 4 °C to facilitate phase separation, followed by centrifugation at 5000 rpm for 20 min. Crude LPS (400 μL) was purified by dialysis for 4 days at 5 °C against deionized water and then was allowed to dry at room temperature. Dried material was re-suspended in 400-μL 2 mM Tris-HCl (pH 7.8) buffer and extracted by partition with an equal volume of phenol/chloroform (1:1, *w*/*v*). After shaking and centrifugation (16,000×*g* for 5 min), the water phase that contained LPS was retained. This extraction procedure was repeated twice. Water phases were pooled and equal volumes of chloroform were added to remove any residual phenol from the water. Water phase was removed and dialyzed against distilled water with three changes of water. LPS were concentrated by alcohol precipitation in sodium acetate to yield a final concentration of 0.15 M, followed by the addition of ice-cold 96% ethanol to yield a final ethanol fraction of 1:4. Mixtures were incubated for 24 h at − 20 °C. Pellets were collected by centrifugation at 4000 rpm and re-suspended in distilled water.

LPS preparations were fractionated on an SDS-PAGE gel (Laemmli 1970) with 4 and 12.5% acrylamide in the stacking and separating gels, respectively. Electrophoresis was performed with 12 mA in the stacking gel and 25 mA in the separating gel. The LPS silver staining procedure was modified from Fomsgaard et al. (1990). Briefly, gels were fixed overnight in 100 mL of 40% (*v*/*v*) ethanol in 5% (*v*/*v*) acetic acid. They were then subjected to a 5-min oxidation in 100 mL distilled water with periodic acid (0.7%) and 40% (*v*/*v*) ethanol in 5% (*v*/*v*) freshly prepared acetic acid. After oxidation, the gels were washed four times for 1 h each with 100 mL distilled water. Then, the gel was incubated for 10 min in freshly prepared silver staining solution consisting of 0.1 N NaOH (18.66 mL), concentrated (29.4%) ammonium hydroxide (1.33 mL), and 20% (*w*/*v*) silver nitrate (3.33 mL), with distilled water added to yield a final volume of 100 mL. After staining, the gels were washed three times for 15 min with 100 mL of distilled water. The gels were developed for 10 to 20 min by incubation in 100-mL freshly prepared developer solution (citric acid [5 mg], 37% formaldehyde [0.05 mL], distilled water) and then transferred to a stop bath (100 mL of distilled water plus 0.35% [*v*/*v*] acetic acid) for a 1-h incubation.

Wheat seedling treatment and analysis

Seedlings were aseptically transferred to assay tubes (15 cm long and 2.5 cm wide) in which only the roots were immersed in 5-mL liquid Murashige and Skoog (MS) medium (pH 5.7). Inoculation was performed by adding *A. brasilense* cells or various concentrations of LPS in MS medium. Measurements were taken when plant growth reaches the top of the assay tubes, normally at 4 days after treatment. Leaf length, root length, or fresh weight were assessed in wheat seedling after treatments. Chlorophyll *a* and carotenoids were measured according to Zavřel et al. (2015). Starch content was according to Takeshita et al. (2015). Briefly, root tissues were ground with liquid nitrogen and homogenized in 1 mL distilled water, and then centrifuged. The supernatant was used to measure starch content. A 200-μL aliquot of supernatant was mixed with 5-μL aliquot of Lugol's solution followed by mixing of the suspension. After incubation at 50 °C for 10 min, the absorbance at 660 nm was read, and the final value was normalized to the OD_{660} nm of an unstained control.

Unless otherwise indicated, all chemicals were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Reactive oxygen species analysis

To visualize the localization and/or rate of $O_2^{\cdot-}$ production, seedlings were stained for 15 min with a solution of 0.1% nitro blue tetrazolium (NBT) in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5. Stained tissue was cleared by boiling in ethanol before photographs were taken (Causin et al. 2012). Hydrogen peroxide was visually detected in using 3,3-diaminobenzidine (DAB) as substrate. Seedlings were placed in Petri dishes containing DAB solution (1 mg/mL, pH 3.8) for 2 h under light at 25 °C. The assay was based on the instant polymerization of DAB when it comes into contact with H_2O_2 (Orozco-Cárdenas and Ryan 1999).

H_2O_2 was assayed using POX as catalyst and guiacol as substrate (Tiedemann 1997). Root tissue was pulverized with liquid nitrogen and homogenized in 1 mL of 25 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0). H_2O_2 was measured by incubating 100 μL of the medium with 900-μL reagent mixture containing 0.05% guiacol (440 μL L^{-1}), and peroxidase from horseradish (350 μL L^{-1}; 2500 U mL^{-1}) dissolved in 25 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) for 15 min at room temperature in the dark. Absorbance at 450 nm was measured immediately.

To analyze the effect of catalase on plant growth, 3-day-old seedlings were transferred to Petri dishes containing 20 mL of catalase (50 or 100 units; one unit (U) of catalase

will decompose 1.0 μmol of H_2O_2per minute at pH 7.0 at 25 °C) dissolved in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0). Images were taken after 3 days of treatment.

Proanthocyanidins binding procedure

Procyanidin B2, a proanthocyanidin structured by (−)-Epicatechin-(4β → 8)-(−)-epicatechin, at different concentrations (5 or 10 μg mL^{-1}) were incubated with LPS (100 μg mL^{-1}) for 30 min at room temperature (~ 25 °C) in the dark. The mixture of LPS plus procyanidin was fractionated on an SDS-PAGE gel as was previously described already. After incubation, the mix was added to assay tubes (15 cm long and 2.5 cm wide) containing aseptically transferred seedlings in which only the roots were immersed in 5-mL liquid Murashige and Skoog (MS) medium (pH 5.7). Measurements of plant growth parameters, POX activity, or ROS production were taken when plant growth reaches the top of the assay tubes, normally at 4 days after treatment.

Total peroxidase assay

Plant tissue (0.5 g) was crushed in liquid nitrogen with a mortar and pestle. The resulting powder was homogenized in 10 mM sodium phosphate, pH 6.0, using a vortex homogenizer for 30 s. Homogenates were stirred on ice for 1 h and centrifuged at 20,000×*g* for 20 min. Supernatants were used for POX assays (Svalheim and Robertsen 1990). Soluble POX activity was analyzed by monitoring the formation of tetraguaiacol in a Beckman DU 530 spectrophotometer (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA). Each reaction mixture (1 mL) consisted of 10-μL enzyme extract and 990-μL guaiacol solution that contained 0.25% guaiacol (*v*/*v*) in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) and 0.125% H_2O_2 (*v*/*v*). POX activity in the extracts was measured based on an increase in absorbance at 470 nm. The reaction was linear over time and was monitored for 5 min. Protein content in the extracts was determined (Bradford 1976) using Bio-Rad dye reagent (Bio-Rad, Hercules, CA) with bovine serum albumin as a standard.

Apoplastic fluids were obtained to assay POX activity (Córdoba-Pedregosa et al. 2003). Briefly, apoplastic components were obtained from vacuum infiltrates (4 °C, 5 min, 60 kPa) in 0.01 M phosphate buffer medium containing 1 M NaCl followed by centrifugation at 1500×*g* for 5 min. Using this procedure, we obtained 70–100-μL apoplastic fluids for every ~ 1 g tissue. As there was no detectable glucose 6-phosphate (Creissen et al. 1999) in the apoplastic fluid, we concluded that this procedure did not result in any contamination with intracellular materials (data not shown).

Data analysis

All experiments were performed at least three times with ten replicates each. The statistical analysis was performed using the Stat software (STATISTICA version 5.0, Statsoft Inc. 1995, Tulsa, OK, USA). The Student's *t* test was used to assess the significance of differences between treatments and control at $P \leq 0.05$.

Results

Effect of *A. brasilense* or LPS on wheat growth

LPS were extracted from *A. brasilense* analyzed by SDS-PAGE to confirm their integrity (Fig. 1). *A. brasilense* (1×10^6 CFU mL^{-1}) inoculation and LPS-treatment promoted an increase in wheat seedling biomass. A dose-response effect on wheat growth was observed in LPS-treated seedlings. The LPS treatment promoted an increase in biomass from 10 to 500 μg mL^{-1}, and no further increase was observed at higher concentrations (Tables 1 and 2). Also, an effect in leaf and root length with both treatment bacteria and LPS was observed. Bacteria increased leaf length and root length by 14.9 and 30.95%, respectively, while LPS-treated leaf and root tissues grew 30 and 35% larger than controls, respectively. The promoting effect of LPS on plant growth was also observed 60 days after treatment with LPS (data not shown).

Effect of LPS on ROS production and its effect on plant growth

An increase of $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 production in response to LPS (100 μg mL^{-1}) treatment was observed in wheat roots, with more significant increase on the root tip (Fig. 2a). To analyze the effect of H_2O_2 on plant growth, we first treated seedlings with different catalase U, which catalyze the decomposition of hydrogen peroxide to water and oxygen, and then measured H_2O_2 content in roots. Treatment with catalase (50 U) clearly decreased the content of these ROS, no additional decrease was observed increasing catalase concentration. When seedlings were grown in presence of 50 U of catalase for 3 days, a decrease in growth was observed in relation to controls without catalase (Fig. 2b).

Effect of PAC on pigments and starch content in wheat seedlings

The possibility that LPS-binding compounds inhibit LPS interaction with LPS-responsive cells was analyzed in wheat seedlings. First, the association of LPS with PAC was analyzed by SDS-PAGE. Changes in the mobility pattern of LPS were observed with the addition of PAC, suggesting an

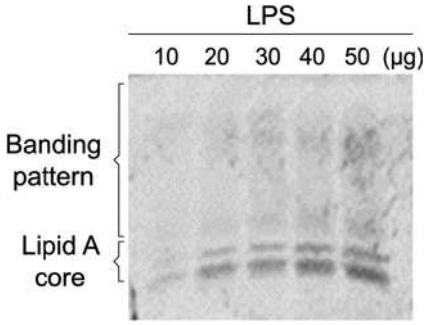


Fig. 1 LPS profiles as revealed by silver stained SDS-PAGE

interaction between both molecules (Fig. 3). We analyzed some parameters such as biomass, pigments, and starch content in wheat seedlings treated with a mixture of PAC and LPS (Table 3). LPS increased the biomass in relation to untreated controls and a higher increase was observed with PAC. The mixture of PAC (5 μg mL^{-1}) plus LPS (100 μg mL^{-1}) inhibited the biomass increase previously observed with the addition of LPS alone. A slight decrease in chlorophyll content was observed in seedlings treated with LPS, but no changes in chlorophyll content were observed with the mixture of PAC plus LPS, in relation to control. No changes in the content of carotenoids were observed with any treatment. Important changes in root starch content were observed. Starch content notably increased in LPS-treated seedlings, but same values to control were observed with PAC plus LPS.

Effect of PAC on POX activity and H_2O_2 production in LPS-treated wheat seedlings

Total POX activity increased in roots of wheat seedlings treated with LPS (100 μg mL^{-1}) (Fig. 4). Seedlings treated with PAC- or PAC plus LPS had the same levels of total POX activity as the control. It has been reported that POX enzymes involved in plant growth are ionically bound to plant cell walls (Kukavica et al. 2012). To analyze the effects of LPS compared with *A. brasilense* treatment on ionically cell wall-associated POX, root tissues were extracted by the infiltration of 1 M NaCl buffer. The release of total ionic proteins increased the amount of total proteins extracted in both *A. brasilense* and LPS-treated roots. Apoplastic POX activity sharply increased by LPS treatment (111% over control), suggesting that POX enzymes, located in the cell wall, were stimulated by LPS and released with increased ionic strength (Table 4). These cell wall-associated POX enzymes could be related with the biochemical responses of wheat to *A. brasilense* LPS.

PAC induced the production of H_2O_2 to higher levels than that observed in seedlings treated with LPS. The mixture of PAC plus LPS slightly decreased the content of H_2O_2 in seedlings but not as low as control levels, relatively higher levels of H_2O_2 were observed with increasing concentrations of PAC in the mixture (Fig. 5).

Table 1 Effect of *A. brasilence* lipopolysaccharides on wheat biomass

Treatment		Wheat seedling biomass	
		FW (g)	DW (g)
Control		0.0746 ± 0.0051^a	0.0294 ± 0.0024^a
A. brasilence (1×10^6 CFU mL^{-1})		0.1344 ± 0.0034^b	0.0399 ± 0.0020^b
LPS (μg mL^{-1})	10	0.1172 ± 0.0101^a	0.0404 ± 0.0024^a
	100	0.1074 ± 0.0088^a	0.0402 ± 0.0033^a
	500	0.1173 ± 0.0076^a	0.0401 ± 0.0026^a
	1000	0.0913 ± 0.0073^b	0.0310 ± 0.0011^b

Results are expressed as means ± SD. Different letters indicate significant differences among treatments according to Student's *t* test at $P \leq 0.05$

Table 2 Wheat growth parameters in seedlings treated with LPS or *A. brasilence*

Treatment	Leaf length (cm)	Root length (cm)
Control	9.02 ± 0.308^a	4.07 ± 0.087^a
A. brasilence (1×10^6 CFU mL^{-1})	10.38 ± 0.474^b	5.33 ± 0.522^b
LPS (100 μg mL^{-1})	11.73 ± 0.218^b	5.51 ± 0.347^b

Results are expressed as means ± SD. Different letters indicate significant differences among treatments according to Student's *t* test at $P \leq 0.05$

Discussion

Most reports of the effects of LPS in plants have been associated with the activation of defense responses, including oxidative burst (Desaki et al. 2006), nitric oxide production (Zeidler et al. 2004), and the induction of pathogenesis-related gene expression and pathogenesis-related (PR) proteins (Coventry and Dubery 2001; Silipo et al. 1998). However, LPS also appears to play a role in plant growth as previously reported by Evseeva et al. (2011), demonstrating that treatment of wheat seedling roots with *A. brasilense* Sp245 LPS increased the mitotic index and the proliferative antigen of initials (PAI), which is present in actively dividing meristematic cells, suggesting that LPS molecules are an active component of the *Azospirillum* cell surface in the induction of plant cell responses.

The present study evaluates the effect of PAC on plant responses activated by *A. brasilense* LPS in wheat seedlings, as an approach to elucidate the mechanisms involved in LPS-mediated plant responses. Based on the recognition of LPS by putative receptors located in the plasma membrane of plant cells, we explore if this recognition is blocked by PCA, by complex formation with LPS, inhibiting its interaction with plant cells.

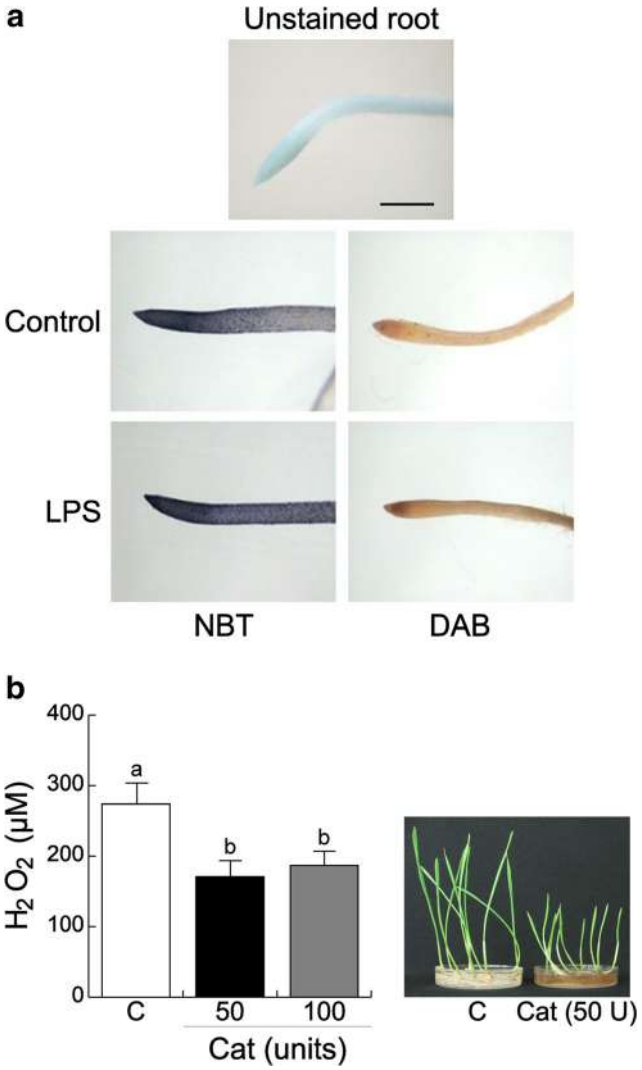


Fig. 2 Effect of LPS on ROS production in wheat roots and on plant growth. **a** Wheat roots treated with LPS (100 µg mL^{-1}) for 4 days and stained with NBT for $O_2^{\cdot-}$ or DAB for H_2O_2. **b** Content of H_2O_2 in roots treated with different units of catalase, and wheat seedlings incubated by 3 days with catalase. C = control (untreated plants). Representative photographs are shown. Barr = 2 mm. Results are expressed as means ± SD. Different letters indicate significant differences among treatments according to Student's *t* test at $P \leq 0.05$

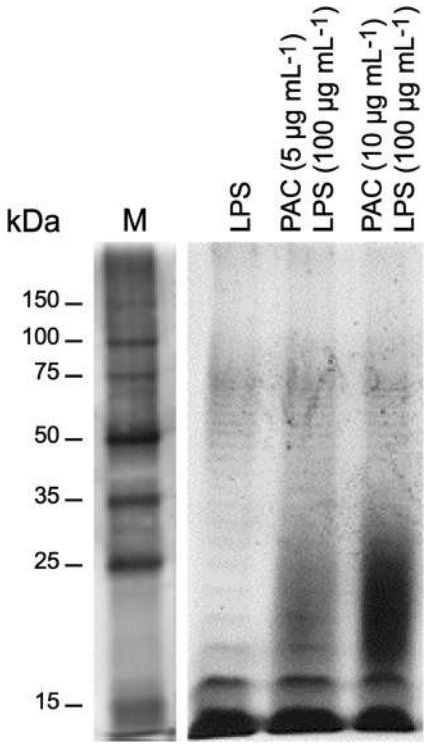


Fig. 3 LPS profiles with different PAC concentrations as revealed by silver stained SDS-PAGE

First, leaf and root growth were measured after LPS treatment to analyze the effect of LPS in plant tissues. We observed an increase in leaf and root lengths; this increase was similar to that observed with whole rhizobacteria inoculation. The correlation of LPS on POX activity was also analyzed. Wheat seedlings treated with LPS exhibited higher levels of total POX activity. Similar results were observed to LPS of *Enterobacter asburiae* strain RS83, a PGPR, in lettuce seedlings (*Lactuca sativa*) compared with controls, and had less disease incidence against *Pectinobacterium catovorum* subsp. *catovorum*, suggesting a role in the induction of early defensive enzymes (Jetiyanon and Plianbangchang 2013). Nevertheless, it is still unclear if the increase in POX activity, in response to LPS treatment, is inherently related to plant growth per se.

LPS stimulated a high extracellular POX activity in root tissue infiltrated with 1 M NaCl buffer, indicating that these treatments induced POX enzymes located in the cell wall. This increase in cell wall POX activity induced by LPS may be related to cell wall loosening contributing to plant growth. In plants, POX are versatile enzymes with a large number of genes reported, 73 genes in *Arabidopsis thaliana* (Tognolli et al. 2002), 138 genes in *Oryza sativa* (Passardi et al. 2004a), and 93 genes in *Populus trichocarpa* (Ren et al. 2014), and have a diverse range of functions. It has been demonstrated that these enzymes have an important role in plant development. For example, Arabidospsis seedlings lacking of Atprx33 transcripts have shorter roots than the wild-type control and overexpressing AtPrx34 exhibit significantly longer roots. Both Atprx 33 and Atprx34 were localized in the cell walls of roots (Passardi et al. 2006). At the same way, heterologous expression of CpPrx01 from *Cucurbita pepo* in *A. thaliana* resulted in longer roots and hypocotyls than in the wild-type control, with a significant reduction in the endogenous indole-3-acetic acid (IAA) level (Cosio et al. 2009). These class III peroxidases are generally secreted into cell walls or both the surrounding medium and vacuole (Matsui et al. 2003). Ionic POX has been reported to be bound to the cell wall (Ros-Barcelo et al. 2002). We observed an increasing ionic POX activity in wheat roots treated with *A. brasilense*

Table 3 Effect of PAC on wheat growth parameters stimulated by LPS

Treatment	Biomass (mg)	Chl_a (μg mL^{-1})	Carotemoids (μg mL^{-1})	Starch (μg g^{-1})
Control	175.4 ± 15.63[a]	0.441 ± 0.038[a]	4.31 ± 0.063[a]	14.2 ± 3.56[a]
LPS (100 μg mL^{-1})	180.6 ± 14.17[b]	0.396 ± 0.027[b]	4.27 ± 0.138[a]	33.7 ± 5.34[b]
PAC (10 μg mL^{-1})	191.6 ± 16.67[b]	0.461 ± 0.009[c]	4.35 ± 0.006[a]	13.9 ± 1.64[a]
PAC (5 μg mL^{-1}) + LPS (100 μg mL^{-1})	167.4 ± 23.81[a]	0.455 ± 0.051[a]	11.9 ± 2.76[a]	11.9 ± 2.76[a]
PAC (10 μg mL^{-1}) + LPS (100 μg mL^{-1})	153.6 ± 21.13[a]	0.453 ± 0.005[c]	14.2 ± 5.02[a]	14.2 ± 5.02[a]

Results are expressed as means ± SD. Different letters indicate significant differences among treatments according to Student's *t* test at $P \leq 0.05$

LPS, indicating that POX in the cell wall were stimulated by these molecules and contribute to plant growth.

POX can be considered bifunctional enzymes that oxidize various substrates in the presence of H_2O_2, but can also produce reactive oxygen species (ROS). POX are associated with the cell elongation processes, and also with reactions that restrict growth (Passardi et al. 2004b). Changes in the internal structure of the cell wall can be achieved by peroxidases via peroxidative or hydroxylic cycles. These processes can favor elongation by generating oxygen radicals (the hydroxylic cycle) or regulating the local concentration of H_2O_2 (the peroxidative cycle) (Passardi et al. 2004b). In the regular peroxidative cycle, POX reduces a H_2O_2 molecule to water, and when the substrate is a suitable molecule for ROS production, the derivate radical reacts with O_2 to generate $O_2^{\cdot-}$. In accordance with Fenton reaction, $O_2^{\cdot-}$ generates $^{\cdot}OH$, thus POX are a key factor to generate ROS (Shigeto and Tsutsumi 2016).

The importance of ROS to regulate plant growth is supported by pharmacological studies with inhibitors or promoters of ROS production suggesting that oxidative scission

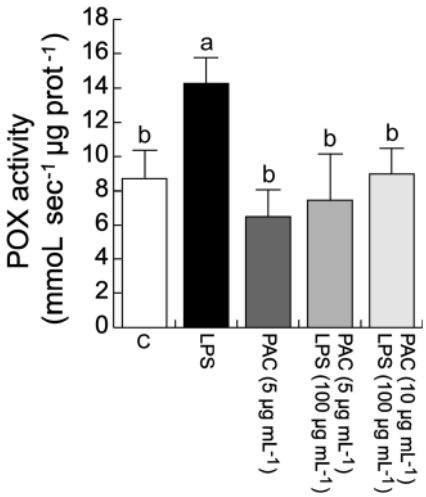


Fig. 4 Effect of LPS plus PAC on total POX activity. Wheat seedlings treated with a mixture of LPS and PAC and total POX activity analyzed 4 days after treatment in root tissue. C = control (untreated plants). LPS = lipopolysaccharides; PAC = procyanidins. Results are expressed as means ± SD. Different letters indicate significant differences among treatments according to Student's *t* test at $P \leq 0.05$

of cell wall polysaccharides induced by hydroxyl radicals ($^{\cdot}OH$) generated in a POX-mediated reaction is essential for normal root growth (Liszkay et al. 2004). Further evidence shows that in vivo $^{\cdot}OH$ production in the apoplast causes in vivo scission of specific cell wall polysaccharides in elongating maize coleoptiles (Fry 1998; Chen and Schopfer 1999; Muller et al. 2009).

$O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 are differentially distributed in the root tissue of Arabidopsis (Dunand et al. 2007) with $O_2^{\cdot-}$ accumulating mainly in expanding meristem cells, while H_2O_2 accumulates in the elongation zone; an overlap of both types of ROS is observed within the transition zone (Wells et al. 2010). There seems to be an equilibrium between these two ROS controlling the transition between root cell proliferation and differentiation which in turn is regulated by the transcription factor (TF) UPBEAT1 (UPB1), a member of the basic/helix loop-helix TF family. TF expression is increased in the root transition zone (Tsukagoshi et al. 2010). UPB1 plays a key role in maintaining the balance of $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 via control on POX expression because a set of POX was repressed by this TF (Tsukagoshi et al. 2010).

Pharmacological experiments with POX inhibitors are in progress to clarify if ROS produced in wheat roots in response to *A. brasilense* LPS is related with apoplastic POX activity. Also, further research will be needed to increase our understanding of the mechanism of rhizobacterial LPS affecting POX activity, which are important enzymes involved in plant growth.

The characterization of PAC/LPS interaction can be used as an approach to study the primary interaction of LPS with plant cells. The interaction of PACs from cranberry and black tea with lipopolysaccharide from several bacterial species has been previously described (Delehanty et al. 2007). That report indicated that PACs specifically bound and neutralized the endocytosis of LPS by blocking its interaction with cognate LPS receptors.

In our study, the biochemical responses in wheat seedlings activated by *A. brasilense* LPS were inhibited by a mixture of PAC and LPS, suggesting that the recognition of LPS by plant cell receptors located in the plasma membrane is an important early event in the activation of biochemical responses involved with plant growth. Recently, a receptor-like kinase

Table 4 Protein content and apoplastic POX activity in wheat roots treated with *A. brasilence* or LPS

Treatment	AP (μg mL^{-1})	Apoplastic POX (μmol s^{-1} μg $prot^{-1}$)
Control		
Buffer	0.38 ± 0.08^a	3234 ± 47^a
Buffer + NaCl	0.79 ± 0.086^b	4250 ± 92^b
A. brasilence (1×10^6 CFU mL^{-1})		
Buffer	0.50 ± 0.07^a	3120 ± 30^a
Buffer + NaCl	0.75 ± 0.04^b	7980 ± 35^b
LPS (100 μg mL^{-1})		
Buffer	0.79 ± 0.08^a	2470 ± 56^a
Buffer + NaCl	0.93 ± 0.02^b	8997 ± 49^b

Results are expressed as means ± SD. Different letters indicate significant differences among treatments according to Student's *t* test at $P \leq 0.05$

Results are shown as mean ± SD obtained from three replicates of 10 seedlings each

Ap apoplastic protein

(RLK), belonging to the plant-specific class of bulb-type lectin S domain 1 kinase (SD-RLKs), has been reported mediating the sensitive perception of *Pseudomonas* and *Xanthomonas* LPS in *A. thaliana* (Ranf et al. 2015). Whether the same cell membrane receptors are used by plants to differentiate between pathogen and beneficial bacteria LPS or not is known at the moment.

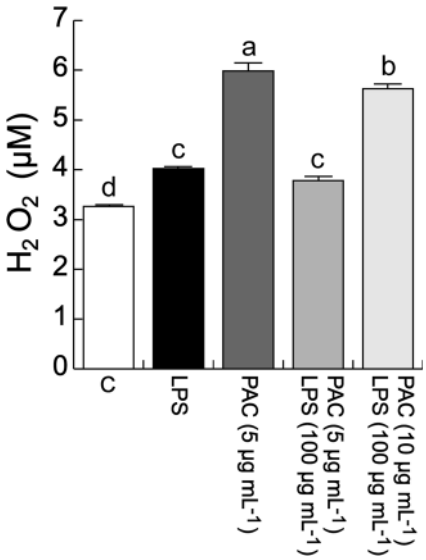


Fig. 5 Effect of LPS plus PAC on H_2O_2 production. Wheat seedlings treated with a mixture of LPS and PAC. H_2O_2 was analyzed 4 days after treatment in root tissue. C = control (untreated plants). LPS = lipopolysaccharides; PAC = procyanidins. Results are expressed as means ± SD. Different letters indicate significant differences among treatments according to Student's *t* test at $P \leq 0.05$

Author's contribution

J. Vallejo-Ochoa, M. Lopez-Marmolejo, M. Méndez-Gómez, L. N. Suárez-Soria: all experiments of this study. E Castro-Mercado: technical support, and E. García-Pineda: author of idea of the work and text.

Acknowledgements This study was supported by the Coordinación de la Investigación Científica, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México.

We thank Gabriela Ibarra-Barrera for improving the English version of this manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Baldani VLD, Alvarez d B, MA BJI, Dobereiner JD (1986) Establishment of inoculated *Azospirillum* spp in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. Plant Soil 90:35–46. https://doi.org/10.1007/BF02277385

Bashan Y, de-Bashan LE (2005) Bacteria/plant growth-promotion. In: Hillel D (ed) Encyclopedia of soils in the environment. Elsevier, Oxford, pp 103–115

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principles of protein dye-binding. Anal Biochem 72:248–254

Brownleader MD, Hopkins J, Mobasheri A, Dey PM, Jackson P, Trevan M (2000) Role of extension peroxidase in tomato (*Lycopersicon esculentum*mill.) seedling growth. Planta 210:668–676. https://doi.org/10.1007/s004250050058

Causin HF, Roqueiro G, Petrillo E, Láinez V, Pena LB, Marchetti CF, Gallego SM, Maldonado SI (2012) The control of root growth by reactive oxygen species in *Salix Nigra* marsh. seedlings. Plant Sci 183:197–205

Chen SX, Schopfer P (1999) Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. Eur J Biochem 260: 726–735. https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00199.x

Chuang TH, Ulevitch RJ (2000) Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. Eur Cytokine Netw 11:372–378

Chuang T, Ulevitch RJ (2001) Identification of hTLR10: a novel human toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. Biochim Biophys Acta 1518:157–161. https://doi.org/10.1016/S0167-4781(00)00289-X

Córdoba-Pedregosa MC, Córdoba F, Villalba JM, González-Reyes JA (2003) Differential distribution of ascorbic acid, peroxidase activity, and hydrogen peroxide along the root axis in *Allium cepa* L. and its possible relationship with cell growth and differentiation. Protoplasma 221:57–65. https://doi.org/10.1007/s00709-002-0069-9

Cosio C, Vuillemin L, De Meyer M, Kevers C, Penel C, Dunand C (2009) An anionic class III peroxidase from zucchini may regulate hypocotyl elongation through its auxin oxidase activity. Planta 229:823–836. https://doi.org/10.1007/s00425-008-0876-0

Coventry HS, Dubery IA (2001) Lipopolysaccharides from*Burkholderia cepacia*contribute to an enhanced defense capacity and the induction

of pathogenesis-related proteins in*Nicotiana tabacum*. Physiol Mol Plant Pathol 58:149–158. https://doi.org/10.1006/pmpp.2001.0323

CreissenGJ, FirminM, FreyerB, KularN, LeylandH, ReynoldsG, PastoriF, WellburnN, BakerA, MullineauxWP (1999) Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco paradoxically caused increased oxidative stress. D.K. Maheshwari (ed.), bacteria in agrobiology: cropEcosystems, pp 189–235

da Silva Correia J, Soldau K, Christen U, Ulevitch RJ (2001) Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. Transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. J Biol Chem 276:21129–21135. https://doi.org/10.1074/jbc.M009164200

Delehanty JB, Johnson BJ, Lin B, Ligler FS (2007) Binding and neutralization of lipopolysaccharides by plant proanthocyanidins. J Nat Prod 70:1718–1724. https://doi.org/10.1021/np0703601

Desaki Y, Miya A, Venkatesh B, Tsuyumu S, Yamane H, Kaku H, Minami E, Shibuya N (2006) Bacterial lipopolysaccharides induce defense responses associated with programmed cell death in rice cells. Plant Cell Physiol 47:1530–1540. https://doi.org/10.1093/pcp/pcl019

Dow M, Newman MA, von Roepenack E (2000) The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. Annu Rev Phytopathol 38:241–261. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.241

Du X, Poltorak A, Wei Y, Beutler B (2000) Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. Eur Cytokine Netw 11:362–371

Dunand C, Crevecoeur M, Penel C (2007) Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in Arabidopsis root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. New Phytol 174:332–341. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.01995.x

Dunford HB (1999) Heme Peroxidases. John Wiley, Chichester

Erbs G, Newman MA (2003) The role of lipopolysaccharide in induction of plant defence responses. Mol Plant Pathol 4:421–425. https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00179.x

Erbs G, Newman MA (2012) The role of lipopolysaccharide and peptidoglycan, two glycosylated bacterial microbe-associated molecular patterns (MAMPs), in plant innate immunity. Mo Plant Pathol 13:95–104. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00730.x

Esitken A (2011) Use of plant growth promoting Rhizobacteria in horticultural crops. D.K.Maheshwari(ed.),bacteriainagrobiology: cropecosystems. Springer-Verlag, BerlinHeidelberg, pp 189–235

Everse J, Everse KE (1991) Peroxidases in Chemistry and Biology, vols 1–2. CRC Press, Boca Raton

Evseeva NV, Matora LY, Burygin GL, Dmitrienko VV, Shchyogolev SY (2011) Effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharides on the functional activity of wheat root meristematic cells. Plant Soil 346:181–188. https://doi.org/10.1007/s11104-011-0808-9

Fibach-Paldi S, Burdman S, Okon Y (2012) Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol Lett 326:99–108. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02407.x

Fomsgaard A, Freudenberg MA, Galanos C (1990) Modification of the silver staining technique to detect lipopolysaccharide in polyacrylamide gels. J Clin Microbiol 28:2627–2631

Fry SC (1998) Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. Biochem J 332:507–515

Gerber IB, Zeidler D, Durner J, Dubery IA (2004) Early perception responses of *Nicotiana tabacum* cells in response to lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia*. Planta 218:647–657. https://doi.org/10.1007/s00425-003-1142-0

Greenberg JA, Newmann SJ, Howell AB (2005) Consumption of sweetened dried cranberries versus unsweetened raisins for inhibition of uropathogenic *Escherichia coli* adhesion in human urine: a pilot study. J Alter Complement Med 11:875–878. https://doi.org/10.1089/acm.2005.11.875

Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H (2001) A large family of class III plant peroxidases. Plant Cell Physiol 42:462–468. https://doi.org/10.1093/pcp/pce061

Jetiyanon K, Plianbangchang P (2013) Lipopolysaccharides of *Enterobacter asburiae* strain RS83: a bacterial determinant for induction of early defensive enzymes in *Lactuca sativa* against soft rot disease. Biol Control 67:301–307. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.09.014

Johnson-White B, Buquo L, Zeinali M, Ligler FS (2006) Prevention of nonspecific bacterial cell adhesion in immunoassays by use of cranberry juice. Anal Chem 78:853–857. https://doi.org/10.1021/ac051700v

Kukavica BM, Veljovicc-Jovanovicc SD, Menckhoff L, Luthje S (2012) Cell wall-bound cationic and anionic class III isoperoxidases of pea root: biochemical characterization and function in root growth. J Exp Bot 63:4631–4645. https://doi.org/10.1093/jxb/ers139

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680–685

Leeman M, Van Pelt JA, Den Ouden FM, Heinsbroek M, Bakker PAHM, Schippers B (1995) Induction of systemic resistance against *Fusarium* wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. Phytopathology 85:1021–1027. https://doi.org/10.1094/Phyto-85-1021

Lin W, Okon Y, Hardy RWF (1983) Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. Appl Environ Microbiol 45:1775–1779

Lipson SM, Sethi L, Cohen P, Gordon RE, Tan IP, Burdowski A, Stotzky G (2007) Antiviral effects on bacteriophages and rotavirus by cranberry juice. Phytomedicine 14:23–30. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2006.11.009

Liszkay A, Van Der Zalm E, Schopfer P (2004) Production of reactive oxygen intermediates $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2, and $^{\cdot}OH$ by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. Plant Physiol 136:3114–3123. https://doi.org/10.1104/pp.104.044784

Matsui T, Nakayama H, Yoshida K, Shinmyo A (2003) Vesicular transport route of horseradish C1a peroxidase is regulated by N- and C-terminal propeptides in tobacco cells. Appl Microbiol Biotechnol 62:517–522. https://doi.org/10.1007/s00253-003-1273-z

Muller K, Linkies A, Vreeburg RA, Fry SC, Krieger-Liszkay A, Leubner-Metzger G (2009) In vivo cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth. Plant Physiol 150:1855–1865. https://doi.org/10.1104/pp.109.139204

Munford RS (2008) Sensing gram-negative bacterial lipopolysaccharides: a human disease determinant? Infect Immun 76:454–465. https://doi.org/10.1128/IAI.00939-07

Nürnberger T, Brunner F (2002) Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. Curr Opin Plant Biol 5:318–324. https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00265-0

Okon Y, Vanderleyden J (1997) Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. ASM News 63:366–370

OkonY (1994) *Azospirillum*/plant associations, pp. 175. CRC Press, Boca Raton, FL

Orozco-Cárdenas M, Ryan CA (1999) Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 96:6553

Passardi F, Longet D, Penel C, Dunand C (2004a) The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. Phytochemistry 65:1879–1893. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.06.023

Passardi F, Penel C, Dunand C (2004b) Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. Trends Plant Sci 9:534–540. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.09.002

Passardi F, Tognolli M, Penel MMC, Dunand C (2006) Two cell wall associated peroxidases from Arabidopsis influence root elongation. Planta 223:965–974. https://doi.org/10.1007/s00425-005-0153-4

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. Science 282: 2085–2088

Ranf S, Gisch N, Schäffer M, Illig T, Westphal L, Knirel YA, Sánchez-Carballo PM, Zähringer U, Hückelhoven R, Lee J, Scheel D (2015) A lectin S-domain receptor kinase mediates lipopolysaccharide sensing in Arabidopsis Thaliana. Nat Immunol 16:426–433. https://doi.org/10.1038/ni.3124

Ren LL, Liu YJ, Liu HJ, Qian TT, Qi LW, Wang XR, Zeng QY (2014) Subcellular relocalization and positive selection play key roles in the retention of duplicate genes of Populus class III peroxidase family. Plant Cell 26:2404–2419. https://doi.org/10.1105/tpc.114.124750

Renukadevi KP, Angayarkanni J, Karunakaran G (2012) Extraction and characterization of lipopolysaccharide from *Serratia rubidaea* and its cytotoxicity on lung cancer cell line-nci-h69. Acta Tech Corviniensis 2:97–101

Ros-Barcelo A, Pomar F, Lopes-Serrano M, Martinez P, Pedreno MA (2002) Developmental regulation of the H_2O_2-producing system and basic peroxidase isoenzyme in the *Zinnia elegans* lignifying xylem. Plant Physiol Biochem 40:325–332. https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01376-1

Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ (1990) Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. Science 249:1429–1431

Shigeto J, Tsutsumi Y (2016) Diverse functions and reactions of class III peroxidases. New Phytol 209:1395–1402

Slack JL, Schooley K, Bonnert TP, Mitcham JL, Qwarnstrom EE, Sims JE, Dower SK (2000) Identificationof two major sites in the type I interleukin-1 receptorcytoplasmic region responsible for coupling to proinflammatorysignaling pathways. J Biol Chem 275:4670–4678. https://doi.org/10.1074/jbc.275.7.4670

Silipo A, Molinaro A, Sturiale L, Dow JM, Erbs G, Lanzetta R, Newman MA, Smith AT, Veitch NC (1998) Substrate binding and catalysis in heme peroxidases. Curr Opin Chem Biol 2:269–278. https://doi.org/10.1016/S1367-5931(98)80069-0

Svalheim O, Robertsen B (1990) Induction of peroxidases in cucumber hypocotyls by wounding and fungal infection. Physiol Plant 78: 261–267. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1990.tb02090.x

Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Karine Crozat K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J, Alexopoulou L, Flavell RA, Beutler B (2004) Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. Proc Natl Acad Sci U S A 101:3516–3521. https://doi.org/10.1073/pnas.0400525101

Takeshita T, Takeda K, Ota S, Yamazaki T, Kawano S (2015) A simple method for measuring the starch and lipid contents in the cell of microalgae. Cytologia 80:475–481

Tiedemann AV (1997) Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death during infection of bean 6 Estrés oxidativo en frutos de aguacate leaves with Botrytis Cinerea. Physiol Mol Plant Pathol 50:151–166

Tognolli M, Penel C, Greppin H, Simon P (2002) Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. Gene 288:129–138. https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00465-1

Tsukagoshi H, Busch W, Benfey PN (2010) Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. Cell 143:606–616. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.020

Van Loon LC, Bakker PAHM, Pieterse CMJ (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annu Rev Phytopathol 36:453–483. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.453

Veitch NC, Smith AT (2001) Horseradish peroxidases. Adv Inorg Chem 51:107–162

Wells DM, Wilson MH, Bennett MJ (2010) Feeling UPBEAT about growth: linking ROS gradients and cell proliferation. Dev Cell 19: 644–646. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.10.017

Weiss EI, Houri-Haddad Y, Greenbaum E, Hochman N, Ofek I, Zakay-Rones Z (2005) Cranberry juice constituents affect influenza virus adhesion and infectivity. Antivir Res 66:9–12. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2004.12.011

ZavřelT, SinetovaMA, ČervenýJ (2015) Measurement of chlorophyll a and carotenoids concentration in cyanobacteria.*Bio-protocol*5 (9): e1467. http://www.bio-protocol.org/e1467

Zeidler D, Zahringe U, Gerber I, Dubery I, Hartung T, Bors W, Hutzler P, Durner J (2004) Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. Proc Natl Acad Sci U S A 44:15811–15816. https://doi.org/10.1016/0959-440X(92)90230-5

73 Ciencia Nicolaita

Efecto de lipopolisacáridos y exopolisacáridos de *Azospirillum brasilense* sobre el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*

Arturo Chávez Valenzuela, Manuel Méndez Gómez, Elda Castro Mercado y Ernesto García Pineda

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, UMSNH

Resumen

Las rizobacterias estimulan el crecimiento y el desarrollo de las plantas a las que colonizan. *Azospirillum brasilense* es una rizobacteria Gram negativa que tiene una cubierta externa formada por lipopolisacáridos y exopolisacáridos, las cuales tienen una función importante durante la interacción con las plantas, pero no existen reportes sobre su efecto en la promoción del crecimiento vegetal. En este estudio se analizó el papel de los lipopolisacáridos y de los exopolisacáridos de *A. brasilense* sobre el crecimiento de plántulas de *Arabidopsis thaliana*, utilizando dos cepas mutantes, *exoC* y *rmlD*, afectadas en la producción de exopolisacáridos y lipopolisacáridos, respectivamente. Ambas mutantes fueron incapaces de estimular los cambios morfológicos relacionados con el crecimiento, observados con la cepa silvestre Sp245, y promovieron de manera diferencial la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Los resultados obtenidos permiten sugerir que los

polisacáridos de las rizobacterias son importantes para promover el crecimiento vegetal.

Palabras clave: *Azospirillum brasilense*, exopolisacáridos, lipopolisacáridos, *Arabidopsis thaliana*, especies reactivas de oxígeno

Abstract

Effect of mutants of *Azospirillum brasilense* in the polysaccharides production on the plant growth of *Arabidopsis thaliana*

Rhizobacteria promote plant growth and development. *Azospirillum brasilense* is a Gram negative rhizobacterium with an external coat of lipopolysaccharides and exopolysaccharides, which have an important function during the interaction with plants, however there are no reports on its effect in plant growth promotion. In this study, the role of exopolysaccharides and lipopolysaccharides from *A. brasilense* on *Arabidopsis thaliana* plant growth, using two mutant strains, *exoC* and *rmlD*, affected in the production of exopolysaccharides and lipopolysaccharides, respectively, was analyzed. Both mutants were unable to stimulate morphological changes related with plant growth as was observed with the wild type strain Sp245, and promote differentially the reactive oxygen species production (ROS). The results suggest that the polysaccharides from rhizobacteria are important in promoting plant growth.

Keywords: *Azospirillum brasilense*, exopolysaccharides, lipopolysaccharides, *Arabidopsis thaliana*, reactive oxygen species.

Introducción

Las Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés de Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) son un grupo de bacterias que tienen la capacidad de mejorar el crecimiento vegetal, proteger los cultivos y aumentar la resistencia de las plantas al estrés biótico y abiótico. La mayoría son muy conocidas por afectar directamente el metabolismo de las plantas gracias a su capacidad de sintetizar fitohormonas (Matsumura et al., 2015). Las PGPR pueden ser endófitas, que son las que entran en las estructuras internas de las plantas, o diazótrofos, las de vida libre que fijan nitrógeno (N_2) atmosférico y que se asocian con el sistema radicular de las plantas. Algunos ejemplos de rizobacterias son: *Azospirillum sp., Bacillus sp., Rhizobium sp., Burkholderia sp., Enterobacter sp., Azotobacter sp., Herbaspirillum sp., Pseudomonas sp. y Xanthomonas sp.* Las PGPR pueden

proveer de nitrógeno, fósforo e incluso algunos minerales que se encuentran en pocas cantidades para el desarrollo de la planta (Criollo et al., 2012).

Específicamente, el nombre del género *Azospirillum* proviene del Francés *Azote* nitrógeno y *Spirillum* pequeña espiral. Las bacterias que integran este género son reconocidas por su capacidad de fijar N_2 y han sido aisladas de zonas templadas, tropicales y subtropicales. Son bacterias Gram negativas, con motilidad y puede adaptar su flagelación a diferentes ambientes. Son bacterias con quimitaxis a diferentes compuestos como ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos y compuestos aromáticos localizados en la rizosfera (Parra y Cuevas, 2002). Esta rizobacteria provoca alteraciones significativas en diferentes parámetros del desarrollo y crecimiento de las plantas que coloniza, aumentando el peso seco de la planta, el contenido de nitrógeno, el número de hojas, de granos y brotes, el peso y tamaño del grano, la altura de la planta, el tamaño de la hoja, el índice del área foliar y la tasa de germinación. Se ha visto que induce cambios en el sistema radical provocando un aumento en el número de raíces, el número y longitud de las raíces laterales, incrementando el peso seco de la raíz, así como la pronta aparición de los pelos radicales (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).

Los lipopolisacáridos son moléculas que forman parte de la superficie celular de bacterias Gram negativas y están asociados a la envoltura celular externa de la membrana. Son moléculas constituidas por tres componentes: un lípido, un núcleo de oligosacárido y un polisacárido-O. El lípido A está unido al núcleo de oligosacárido, generalmente constituido por el azúcar 3-desoxi-D-manno-2-octulosonato (KDO). El polisacárido está unido al núcleo oligosacárido y está formado por repeticiones de unidades de diferentes monómeros de azúcares, que se conocen como antígeno-O. El antígeno-O se ha utilizado para la clasificación de las bacterias Gram negativas (Erbs y Newman, 2003). Los lipopolisacáridos contribuyen a la permeabilidad de la membrana externa, ayudando a la supervivencia de la bacteria en ambientes hostiles. Son los encargados de la patogénesis bacteriana en las plantas y pueden excluir sustancias antimicrobianas excretadas por las plantas (Erbs y Newman, 2003). Participan en la adhesión a células y tejidos, una función crucial en su asociación con las plantas (Romero e Iregui, 2010).

Además de los lipopolisacáridos, las rizobacterias también producen exopolisacáridos, polisacáridos estructurales sintetizados por bacterias de todos los taxones (Nwodo et al., 2012). Los exopolisacáridos desempeñan varias funciones, entre ellas está la capacidad para formar biofilms (conjunto de bacterias que pueden

ser de una o varias especies) que protegen a las bacterias contra el estrés ambiental, del ataque de bacteriófagos, de compuestos antimicrobianos y del ataque de algunos protozoos depredadores de bacterias. Otra función que pueden desempeñar los exopolisacáridos es la capacidad de adherencia de las bacterias a superficies biológicas ayudando en la colonización bacteriana (Marta 2011).

Se ha reportado la existencia de mutantes de *A. brasilense* en la producción de lipopolisacáridos y exopolisacáridos. La mutante *exoC* de *A. brasilense* fue reportada inicialmente por Michiels et al. (1988). Esta mutante no elimina la producción de los exopolisacáridos pero sí altera significativamente el tamaño de sus componentes (Michiels et al., 1988). El gen *exoC* codifica para una proteína que es homóloga a la proteína AlgC (fosfomanomutasa) presente en *Pseudomonas aeruginosa* (Fischer et al., 2003). La mutante *rmlD* de *A. brasilense*, inicialmente reportada por Jofre et al. (2004), muestra una modificación en la producción de lipopolisacáridos y una alteración en la morfología de la colonia, incrementa la producción de exopolisacáridos y además son incapaces de colonizar el sistema radical del maíz. El gen *rmlD* codifica para una enzima que sintetiza ramnosa, un componente de la pared celular de las bacterias (Bahat et al., 2004). Estas bacterias no forman agregados en cultivo, pero producen exopolisacáridos ricos en glucosa (Coronado et al., 2008). A pesar de la importancia de estas moléculas durante la interacción bacteria-planta, actualmente se desconoce si su producción está relacionada con la actividad promotora del crecimiento vegetal de las rizobacterias.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés de Reactive Oxygen Species) son necesarias para el desarrollo de las plantas ya que están implicadas en el crecimiento y diferenciación de la raíz. Entre las especies reactivas de oxígeno tenemos al O_2^-, el cual se produce en grandes cantidades en el meristemo y en la zona de elongación de la raíz. Está involucrado en el alargamiento de la raíz. Otra especie reactiva de oxígeno es el H_2O_2. Este compuesto se localiza en la zona de diferenciación de la raíz donde cesa el alargamiento celular, restringe el crecimiento de la raíz y promueve la formación de pelos radicales (Dunand et al., 2007).

A. brasilense es ampliamente utilizado como biofertilizante debido a su capacidad para promover el crecimiento vegetal, principalmente por la producción de fitohormonas. Sin embargo, existen pocos estudios sobre la participación de los componentes de la pared celular bacteriana durante la interacción planta-bacteria. En este estudio se reporta el efecto de *A. brasilense* y de dos mutantes en la producción de polisacáridos, *exoC y rlmD*, sobre el crecimiento *A. thaliana*.

Materiales y métodos

Cepas

Las cepa *Azospirillum brasilense Sp245* y sus derivados mutantes en la producción de polisacáridos *exoC* (Michiels et al., 1988) y *rmlD* (Jofre et al., 2004), fueron donadas por la DC Gladys Alexandre, de la Universidad de Tennessee, U.S.A.

Las cepas se mantuvieron en medio LB mínimo estéril (triptona 10 g/l; extracto de levadura 5 g/l; cloruro de sodio (NaCl) 5 g/l; sulfato de magnesio (MgSO4), 0.186 g/l; cloruro de calcio (CaCl2), 0.277 g/l y agar bacteriológico 15 g/l), suplementado con tetraciclina a una concentración de 10 µg/ml. Se ajustó el pH a 7.0 con hidróxido de sodio (NaOH) 1M con un potenciómetro (Accumet Basic AB15; Fisher Scientific).

Material vegetal

Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* col 0, la cual fue donada por el DC José López Bucio, del Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal, del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

A. thaliana se creció en el medio Murashige y Skoog (MS) al 0.2X adicionado con 1% de sacarosa y 0.8% de Agar Plant (Phyto Technology Laboratories).

Desinfección de semillas de *A. thaliana*

Se desinfectaron las semillas de *A. thaliana* en un tubo Eppendorf con 700 µl de alcohol etílico al 96%, en agitación durante 5 minutos en un Termomix Eppendorf a 1400 rpm. Se desechó el sobrenadante. Se adicionaron 700 µl de cloro al 20%, y se agitó durante 5 minutos. Se realizaron 5 lavados con 700 µl de agua destilada estéril en agitación durante 30 segundos, cada lavado. Las semillas se colocaron en congelación durante 2 días para su siembra en medio MS sólido preparado en cajas Petri de 100 x 15 mm.

Inoculación de *A. thaliana* con *A. brasilense*

Se sembraron 20 semillas de *A. thaliana* en caja Petri, en una campana de flujo laminar. Las cajas fueron selladas con Parafilm y colocadas en una cámara de crecimiento PERCIVAL, a 21.8 °C, durante 6 días.

Se preparó un pre-inóculo de cada cepa en 3 ml de medio líquido LB adicionado con tetraciclina (30 µg/ml) y se incubó en agitación durante 16 h. Se tomaron 150 µl

del cultivo y se adicionaron a un matraz con 50 ml de medio líquido LB. Se incubó a 28°C en agitación constante a 180 rpm durante 16 horas. El cultivo se centrifugó a 3000 rpm, durante 10 min. La pastilla de bacterias se re-suspendió en 1 ml de 0.85 % de NaCl y se centrifugó durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se re-suspendió en 1ml de 0.01 M de $MgSO_4$. Se realizó un conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) para preparar el inóculo, utilizando diferentes diluciones de la suspensión. Las bacterias se inocularon en el medio antes de que solidificara. Se trasplantaron 10 plantas con 6 días de germinación de *A. thaliana* por caja y se sellaron con Parafilm. Las plántulas se incubaron durante otros 6 días. Después del tiempo de incubación se realizó el análisis de los parámetros de crecimiento, peso fresco del follaje, peso fresco de la raíz, longitud de la raíz principal y número de raíces laterales. La raíz principal fue medida con una regla de 30 cm, las raíces laterales se contaron con una lupa estereoscópica (Leica EZ 4D). El peso del tejido se cuantificó con una balanza analítica (Sartorius AX224).

Para analizar la colonización de la raíz, las raíces de las plantas inoculadas con las diferentes cepas de *A. brasilense* se colectaron y se colocaron en un tubo Eppendof con 1 ml de medio líquido LB y se agitaron en Vortex durante 1 min. Se tomaron 100 µl del medio con una micropipeta y se sembraron en una caja Petri de 100 x 15 con medio LB mínimo sólido. Las cajas de incubaron durante 24 h a 28ºC y se analizó el número de UFC.

Tinción para analizar la producción de ERO

Para detectar la producción de anión superóxido (O_2^-) en el tejido de raíz se utilizó la tinción con 0.1% de nitroblue tetrazolium (NBT) y para detectar la producción de peróxido de hidrógeno la tinción con 1 mg/ml de diaminobenzidina (DAB), durante 15 min (Thordal-Christensen 1997). Primero, las raíces se fijaron con 7% de hidróxido de sodio, después se incubaron en etanol al 60% durante 30 minutos a temperatura ambiente, después fueron rehidratadas en etanol al 40% por una noche, luego se colocaron en etanol al 20% durante 30 minutos, después en etanol al 10% y finalmente se mantuvieron en glicerol al 50%. Las plántulas se montaron en porta objetos (2 plantas por porta objetos) y se analizaron en un microscopio Domarsqui (Leica DFC 450 C). Los resultados se documentaron con fotografías.

Análisis estadístico

Se utilizaron 10 plantas por caja, con tres caja por tratamiento (n=30). Los experimentos se repitieron al menos tres veces. A los datos se les aplicó un análisis de ANOVA y la prueba de Tukey, $\alpha<0.05$.

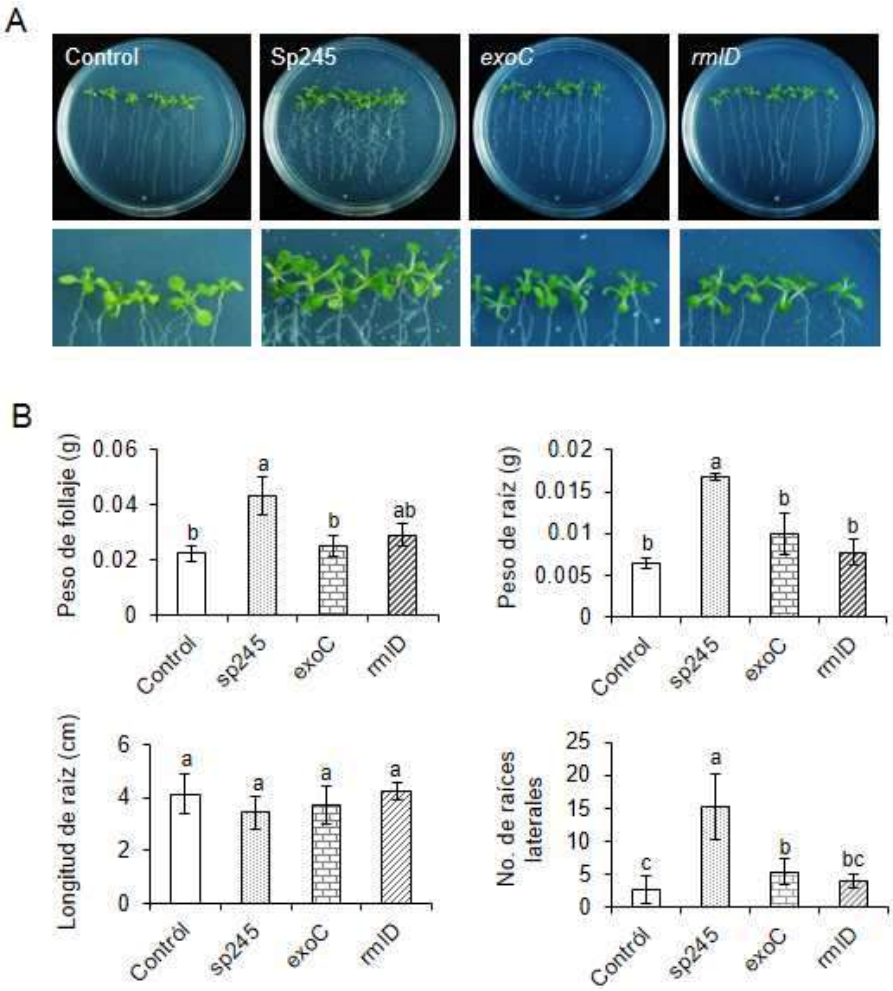


Figura 1. Efecto de *A. brasilense* sobre el crecimiento de *A. thaliana*. **A**. El panel superior muestra el crecimiento completo de las plántulas y el panel inferior muestra un acercamiento de la parte foliar de las plántulas. **B**. Las gráficas muestran el efecto de las cepas de *A. brasilense* sobre diferentes parámetros de crecimiento de A. *thaliana*. N = 30. Las barras representan la desviación estándar. Las letras arriba de las barras indican diferencias entre tratamiento. ANOVA, $\alpha<0.05$.

Resultados

La cepa silvestre de *A. brasilense* Sp245 promovió cambios en la morfología de las plántulas de *A. thaliana*, que se manifestaron como un incremento en el tamaño del follaje y en la formación de raíces laterales (Fig. 1A). Los parámetros del peso fresco del follaje, peso fresco de la raíz y número de raíces laterales también mostraron un incremento en relación con el control. No se observaron cambio significativos en la longitud de la raíz principal (Fig. 1B).

Las cepas mutantes *exoC* y *rlmD* no promovieron los cambios morfológicos en *A. thaliana* como los observados con la cepa silvestre Sp245. El crecimiento del follaje fue similar al control y no se observó la formación de raíces laterales en plántulas (Fig. 1A), tampoco se observaron cambios en los parámetros crecimiento con ninguna de las mutantes analizados, en relación con el control (Fig. 1B).

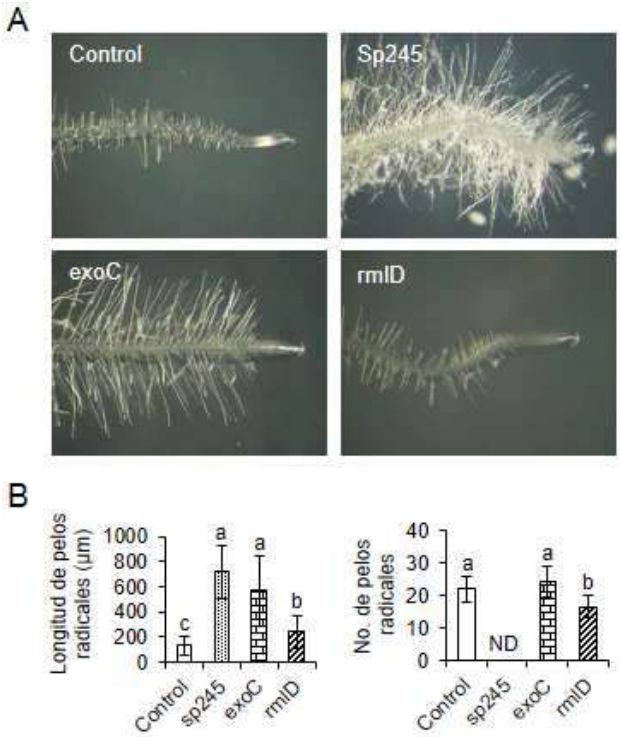


Figura 2. Efecto de *A. brasilense* sobre la morfología de la raíz de *A. thaliana*. **A**. Raíces de *A. thaliana* inoculadas con las diferentes cepas de *A. brasilense*. **B**. Cuantificación de parámetros de crecimiento de la raíz. N = 30. ND = no determinado. Las barras representan la desviación estándar. Las letras arriba de las barras indican diferencias entre tratamiento. ANOVA, $\alpha<0.05$.

Un análisis más detallado sobre el efecto de las diferentes cepas en el crecimiento de la raíz mostró un incremento en la longitud y densidad de pelos radicales en las plántulas inoculadas con la cepa silvestre Sp245, cuya formación se desplazó a la punta de la raíz, en relación con las plántulas no inoculadas (Fig. 2A). El número y la longitud de pelos radicales fue similar en los tratamientos con la cepa silvestre y con la cepa *exoC*, pero las raíces de las plántulas tratadas con la cepa mutante *rmlD* mostraron una morfología similar a las raíces de las plántulas no inoculadas, observándose sólo un ligero incremento en la longitud en relación con el control (Fig. 2B).

La colonización de la raíz de las plántulas, analizada por el número de UFC, mostró diferencias notables entre las tres cepas en su capacidad para asociarse con la raíz (Fig. 3). Se recuperaron aproximadamente $1x10^5$ UFC/ml de las raíces inoculadas con la cepa Sp245, mientras que de la cepa mutante *rmlD* $1x10^4$ UFC/ml, y de la cepa *exoC* $1x10^2$ UFC/ml (Fig. 3). La baja cantidad de bacterias recuperadas de las raíces después de la inoculación con la cepa *exoC* sugiere que los exopolisacáridos contribuyen de forma importante en el proceso de colonización de la raíz.

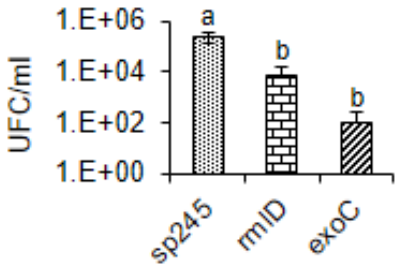


Figura 3. Efecto de la inoculación de *A. brasilense* sobre la colonización de la raíz de *A. thaliana*. N = 30. Las barras representan la desviación estándar. Las letras arriba de las barras indican diferencias entre tratamiento. ANOVA, $\alpha<0.05$.

El análisis histoquímico de la producción de especies reactivas de oxígeno, O_2^- y H_2O_2, en raíces mostró que la concentración de O_2^- se incrementó en repuesta a la inoculación con la cepa Sp245, en relación con el control. Cuando las plantas fueron inoculadas con las cepas mutantes, con la mutante *exoC,* se observó una producción de O_2^- similar al control y una disminución en su producción cuando se inocularon con la mutante *rmlD*. En el caso de la producción de H_2O_2, se observó un cambio en el patrón de su producción en raíces de plántulas inoculadas con la cepa silvestre Sp245 en relación con el control, porque disminuyó en la punta de la raíz y su producción se concentró en zonas alejadas del meristemo, en la zona de

formación de pelos radicales. El patrón de producción en la mutante *exoC* fue similar al observado en el control, pero con la cepa mutante *rmlD* su producción se desplazó hacia la punta de la raíz (Fig. 4).

Figura 4. Efecto de la inoculación de *A. brasilense* sobre la producción de O_2^- (NBT) y de H_2O_2 (DAB) en raíces de *A. thaliana*.

Discusión

Se ha reportado que una de las funciones de los exopolisacáridos es la de proporcionar protección a las bacterias en contra del medio ambiente (Kumar et al., 2007). En las rizobacterias su función parece estar también relacionada con la asociación de las bacterias con la raíz de la planta (Michiels et al., 1988). Los resultados reportados en este trabajo indican que los exopolisacáridos producidos por *A. brasilense* tienen además un papel importante durante la promoción del crecimiento vegetal, una función que no se había reportado previamente para estas moléculas. Esta sugerencia fue apoyada con experimentos realizados con dos cepas afectadas de manera diferente en la producción de exopolisacáridos, una de las cepas (*exoC*), está afectada en la producción de polisacáridos que se excretan el medio extracelular y la otra (*rmlD*), está afectada en polisacáridos que forman parte de la pared secundaria de las bacterias Gram negativas (lipopolisacáridos). Las dos cepas mutantes tuvieren efectos diferentes a la silvestre sobre la promoción del crecimiento vegetal y la colonización de la raíz, lo que sugiere que ambos tipos de polisacáridos están involucrados durante la asociación de la bacteria con la raíz de la planta y su función biológica sobre la misma.

Parece que los polisacáridos también juegan un papel importante en el establecimiento de relaciones simbióticas entre rizobacterias y plantas, como fue reportado por Hirsch (1999). Este autor utilizó también mutantes en la producción

de exopolisacáridos y observó una habilidad disminuida de las bacterias para infectar plantas.

Los resultados con las cepas mutantes también sugieren que es necesaria la integridad estructural de los lipopolisacáridos para su función biológica, porque se ha reportado que las alteraciones en las mutantes modifican la estructura de los lipolisacáridos (Jofre et al., 2004).

Se conoce la estructura química de los lipopolisacáridos de un número de cepas de *Azospirillum*, incluida la cepa utilizada en este estudio (Boyko et al., 2011; Fedonenko et al., 2002; Sigida et al., 2015; 2014). Sin embargo, no se conoce la estructura de los lipopolisacáridos de las cepas mutantes utilizadas en este estudio, por lo tanto no se conoce su grado de modificación estructural.

Cuando se analizó el efecto de las diferentes cepas sobre la colonización de la raíz se observó que las cepas mutantes tienen una capacidad disminuida para colonizar la raíz, lo cual podría influir sobre su capacidad promotora del crecimiento vegetal. Se requiere investigación adicional para saber si las mutantes también están afectadas en la producción de otras moléculas bioactivas relacionadas con la estimulación del crecimiento.

Finalmente, se analizaron los efectos de las diferentes cepas sobre la producción de las especies reactivas de oxígeno. Estas moléculas juegan un papel de señalización muy importante en las plantas, regulando procesos como el crecimiento, el desarrollo y las respuestas de defensa (del Río 2015). Se observó que las diferentes cepas afectaron de forma diferentes su producción en la raíz, observándose una producción disminuida con las mutantes. Esta producción correlacionó con los efectos morfológicos observados en las plantas, lo que sugiere que las mutantes fueron incapaces de influir sobre los procesos bioquímicos relacionados con el crecimiento de las plantas.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Coordinación de la Investigación Científica, de la UMSNH por el apoyo financiero para la realización de este trabajo de investigación.

Los autores agradecen especialmente al DC José López Bucio del IIQB de la UMSNH, por las facilidades otorgadas para utilizar el materia y el equipo necesario para esta investigación.

Literatura citada

Bahat, E. S., S. S. Castro y Y. Okon. 2004. Arabinose content of extracellular polysaccharide plays a role in cell aggregation of *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol Lett 237: 195-203.

Boyko, A. S., S. A. Konnova, Y. P. Fedonenko, E. L. Zdorovenko, O. N. Smol'kina, V. V. Kachala y V. V. Ignatov. 2011. Structural and functional peculiarities of the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* SR55, isolated from the roots of *Triticum durum*. Microbiol Res 166: 585-593.

Coronado, E., E. Galindo y C. Peña. 2008. Papel del alginato en la agregación de *Azotobacter vinelandii* en cultivo sumergido. Revista Colombiana de Biotecnología.1: 10-16.

Criollo, P. J., M. Obando, L. M. Sánchez y R. Bonilla. 2012. Efecto de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) asociadas a *Pennisetum clandestinum* en el altiplano cundiboyasense. Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 13: 189-195.

Del Río, L. A. 2015. ROS and RNS in plant physiology: an overview. J Exp Bot 66: 2827-2837.

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

Erbs, G. y M. A. Newman. 2003. The role of lipopolysaccharides in induction of plant defence. Mol Plant Pathol 4: 421-425.

Fedonenko, Y. P., G. V. Zatonsky, S. A. Konnova, E. L. Zdorovenko y V. V. Ignatov. 2002. Structure of the O-specific polysaccharide of the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* Sp245. Carbohy Res 337: 869-872.

Fischer, S. E., M. J. Miguel y G.B. Mori. 2003. Effect of root exudates on the exopolysaccharide composition and the lipopolysaccharide profile of *Azospirillum brasilense* Cd under saline stress. FEMS Microbiol Lett 219: 53-62.

Hirsch, A. M.1999. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. Curr Opin Plant Biol 2: 320-326.

Jofre, E., A. Lagares y G. Mori. 2004. Disruption of dTDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolysaccharide core, exopolysaccharide production, and root colonization in *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol Lett 231: 267-275.

Kumar, A. S., K. Mody K y B. Jha. 2007. Bacterial exopolysaccharides – a perception. J Basic Microbiol 47: 103-11.

Marta, C. L. 2011. Biological functions of exopolysaccharides from probiotic bacteria. Department of Immunology, Jagiellonian University Medical College. 36: 51-55.

Matsumura, E. E., V. S. Andrade, R. M. Stolf, O. J. A. Pais dos Santos, M. Hungria, y A. L. Martínez de Olivera. 2015. Composition and activity of endophytic bacterial communities in field-grown maize plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. Ann Microbiol 65: 2187-2200.

Michiels, K. W., Y. Vanderleyden, A. P. Van Gool, R. Ethan y A. R. Signer. 1988. Isolation and characterization of *Azospirillum brasilense* loci that correct *Rhizobium meliloti* exoB and exoC mutations. J Bacteriol 11: 5401-5404.

Nwodo, U. U., E. Green y A. L. Okoh. 2012. Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. Int J Mol Sci 13: 14002-14015.

Parra, Y. y F. Cuevas. 2001. Potencialidades de *Azospirillum* como inoculante para la agricultura. Cultivos Tropicales. 3: 31-41.

Romero, S. H. y C. A. Iregui. 2010. El lipopolisacárido. Revista de Medicina Veterinaria. 19: 37-42.

Sigida, E. N., Y. P. Fedonenko, A. S. Shashkov, E. L. Zdorovenko, S. A. Konnova, V. V. Ignatov y Y. A. Knirel. 2015. Structure of the polysaccharides from the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* Jm125A2. Carbohy Res 416: 37-40.

Sigida, E. N., Y. P. Fedonenko, A. S. Shashkov, V. S. Grinev, E. L. Zdorovenko, S. A. Konnova, V. V. Ignatov y Y. A. Knirel. 2014. Structural studies of the polysaccharides from the lipopolysaccharides of *Azospirillum brasilense* Sp246 and SpBr14. Carbohy Res 398: 40-44.

Steenhoudt, O y J. Vanderleyden. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiol Rev 24: 487-506.

Thordal-Christensen, H., Z. Zhang, Y. Wei y D. B. Collinge. 1997. Subcellular localization of H_2O_2 in plants. H_2O_2 accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley—powdery mildew interaction. Plant J 11: 1187-1194

¿Cómo controlan los organismos su crecimiento?

Manuel Méndez Gómez
Es maestro en Ciencias en Biología Experimental, egresado del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas – UMSNH. Actualmente realiza el doctorado en Biología Experimental en el mismo Instituto.

Elda Castro Mercado
Es maestra en Ciencias, en Biología Experimental, por el Instituto de Investigaciones Químico Biológicas – UMSNH. Ha presentado sus trabajos de investigación en congresos nacionales e internacionales y ha publicado artículos en revistas nacionales e internacionales.

Homero Reyes de la Cruz
Es doctor en Ciencias Bioquímicas, por la Facultad de Química de la UNAM. Actualmente es profesor investigador titular en el Instituto de Investigaciones Químico Biológicas – UMSNH, y miembro del SNI. Su área de investigación es el control traduccional del desarrollo en plantas. Ha publicado artículos en revistas nacionales e internacionales.

Ernesto García Pineda
Es doctor en Ciencias en Biotecnología de Plantas, por el Departamento de Ingeniería Genética, CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato. Actualmente es profesor investigador titular en el Instituto de Investigaciones Químico Biológicas – UMSNH, y miembro del SNI. Su área de investigación es el estudio de los

La dimensión de un organismo está determinada en gran medida por su composición genética. Esto se refleja, en parte, en la gran variedad de tamaños de los animales y de las plantas que observamos en la naturaleza. Sin embargo, el medio ambiente también tiene un efecto importante sobre esta característica. Por lo tanto, los estudios que nos orientan para entender cómo controla un organismo su crecimiento deben contemplar la participación genética y la influencia del medio ambiente. Independientemente de los factores que operan en el crecimiento, resulta interesante preguntarnos por qué las células de un organismo tienen las dimensiones que las caracterizan, y si podrían ser más grandes, o más pequeñas... Si los organismos voluminosos lo son porque tienen un mayor número de células, o si éstas son más grandes que las de los individuos más pequeños.

Sean del tamaño que sean, todos los seres vivos estamos formados por células, sus componentes básicos; las cuales pueden ser de tamaños diversos en diferentes organismos. Sin embargo, normalmente muestran distribuciones similares en cuanto a tamaño, en un mismo espécimen. Todas ellas se generan mediante un proceso conocido como *división celular*.

Cuando una célula se divide, debe alcanzar un volumen determinado para poder dividirse de nuevo. El control preciso de este proceso es importante para que una célula no crezca en exceso, ni sea demasiado pequeña.

La envergadura final de un organismo está definida por el crecimiento en el número y en la masa de sus células. Los mecanismos utilizados para mantener este equilibrio, de tal manera que siempre que se genere un individuo mantenga el mismo tamaño, conforman un tema de investigación que ha fascinado a los investigadores desde hace muchos años; sin embargo, permanecen todavía, en su mayor parte, desconocidos. La coordinación entre estos dos eventos —número y masa— es también importante cuando se están formando los diferentes órganos, de modo que el tamaño de los mismos no cambia mucho con el tiempo, y tampoco el de las células.

¿Cómo se determina el crecimiento de las células?

La identidad de un órgano —y en particular, la posición de una célula dentro de éste—, así como su interacción con las células vecinas, tanto en plantas como en animales, llevan a cabo una importante función en su ritmo de crecimiento. Además, también reciben señales externas capaces de controlarlo, por ejemplo, la temperatura y la disponibilidad

de nutrientes son factores que influyen fuertemente en ello y pueden afectar el tamaño final de un organismo.

Qué determina, de manera interna en la célula, hasta dónde crecer para después poder dividirse de nuevo, es un tema biológico del que se sabe relativamente poco. Los escasos conocimientos con los que contamos indican que el tamaño del genoma, los nutrientes y los factores de crecimiento son importantes para controlar su tamaño.

Ahora bien, si las células tuvieran una forma de *sentir* su tamaño, esto podría ser fundamental para el mantenimiento de su volumen y de su número, es decir, podrían *saber* cada cuánto tiempo se tendrían que dividir y hasta dónde crecer en dimensión. Esto implicaría que deberían tener la habilidad de supervisar sus actividades metabólicas, las cuales controlan estos procesos.

Actualmente, no se sabe con certeza cómo lo hacen; no obstante, es interesante preguntarnos cómo miden su tamaño, o el de sus componentes internos.

El estudio del genoma de diferentes organismos ha identificado varios genes y procesos celulares que influyen sobre su tamaño, si bien, es todavía un desafío identificar los mecanismos específicos involucrados en su control.

mecanismos de defensa en plantas. Ha publicado artículos en revistas nacionales e internacionales. C. e.: egpineda@umich.mx

El mundo del grafeno, El llamado material del futuro

Hacia la igualdad de género para una mejor ciencia

La fábrica inteligente: productos a la carta

¿Cómo regulan las células su crecimiento?

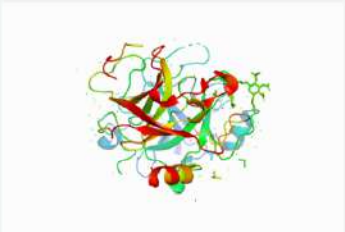
Estudios iniciales con bacterias establecieron que existe una relación entre la velocidad de crecimiento y el tamaño de una célula; además, demostraron que este proceso resulta ser más rápido en un medio rico en nutrientes, lo que deriva en un tamaño más grande. Con esto se descubrió una conexión entre el consumo de nutrientes, la actividad metabólica y el crecimiento celular.

En organismos unicelulares más avanzados, como la levadura, se ha descubierto que algunos nutrientes específicos —como por ejemplo la glucosa— tienen efecto sobre la temporalidad en la que se divide una célula (cada cuándo ocurre esto), así como en su tamaño; es decir, este nutriente puede influir tanto en el número de células como en el volumen que éstas alcanzarán. En contraste, existe poca información sobre la función que desempeñan los nutrientes y el metabolismo en el control del crecimiento en organismos pluricelulares, como los animales y las plantas.

En animales, el conocimiento obtenido se deriva de experimentos que involucran hormonas y algunas vías metabólicas, más que el efecto de nutrientes individuales. Esto manifiesta un papel más complejo de los nutrientes sobre la regulación del crecimiento en animales. Por ejemplo, algunas hormonas —como la insulina— regulan la toma de nutrientes y la actividad metabólica, además de influir sobre la división de las células. Una de sus funciones claves, por lo tanto, es la regulación del metabolismo, el cual es muy importante para el crecimiento celular.

Metabolismo y regulación del crecimiento celular

Como ya se mencionó, las células regulan su crecimiento a través de la modulación del metabolismo, para lo cual utilizan algunas proteínas; una de ellas, especializada en regular la actividad metabólica, es la conocida como TOR (*Target of Rapamycin* o "blanco de la rapamicina", por sus siglas en inglés).



Esta proteína ejerce efectos múltiples sobre el metabolismo, específicamente sobre el relacionado con el crecimiento y la proliferación celular, pues es utilizada por las células para enlazar tres actividades: el metabolismo, la proliferación celular y el crecimiento.

¿Cómo se descubrió esta proteína? Sus estudios se remontan a los años setentas, cuando en una muestra de suelo de la isla Rapa Nui (Isla de Pascua, Chile) se encontró una

bacteria llamada *Streptomyces hygroscopicus*: la cual produce un potente compuesto químico que mata a los hongos (antifúngico). Este compuesto se purificó y se le nombró rapamicina, en alusión al sitio donde se descubrió la bacteria. Posteriormente, se descubrió que, además, inhibe la multiplicación de las células de mamíferos; un efecto importante que estimuló la investigación sobre el funcionamiento de este compuesto. Estudios subsecuentes permitieron conocer que actúa sobre la proteína llamada TOR, inhibiendo su función. Todos los organismos eucariotes (aquellos cuyas células tienen el núcleo celular confinado por una membrana celular) estudiados a la fecha contienen un solo gen *TOR*, lo cual significa que las células producen una única proteína de este tipo, con excepción de la levadura, la cual contiene dos genes y, por lo tanto, produce dos tipos de proteínas.

¿Que hace TOR?

El crecimiento celular es un proceso finamente coordinado, regulado en tiempo y espacio. Cuando las células están en presencia de nutrientes, estimulan su metabolismo para producir más moléculas e incrementar su tamaño y masa. Inversamente, responden a la limitación de nutrientes u otros tipos de estrés, disminuyendo la síntesis de moléculas, lo que resulta en una disminución en su crecimiento.

Bajo las condiciones adecuadas de nutrientes, la proteína TOR puede regular cuánto crece una célula. Así, en presencia de nutrientes, esta proteína se activa y la célula mantiene un ritmo robusto de crecimiento a través de la síntesis de proteínas y el consumo de nutrientes. Si es tratada con rapamicina, se inhibe la función de TOR y disminuye drásticamente la síntesis de proteínas; en consecuencia, también su crecimiento. De este modo, el uso de la rapamicina permite estudiar la función de la proteína durante el crecimiento celular.

Además de controlar el crecimiento, TOR afecta también el desarrollo, porque se ha observado que en el gusano nemátodo y en la mosca de la fruta su inhibición detiene el desarrollo, y retrasa la diferenciación de neuronas. Por el contrario, su sobre-activación conduce a una diferenciación acelerada. En embriones de ratones, la falta de TOR tiene efectos semejantes a la falta de aminoácidos en el desarrollo, sugiriendo que TOR coordina el crecimiento y el desarrollo como respuesta a la presencia de nutrientes. Lo anterior podría explicar por qué una alimentación adecuada es necesaria para el crecimiento y el buen desarrollo de un organismo.

Resulta interesante que, durante la etapa adulta en levaduras, gusanos y moscas, la inhibición parcial de TOR deriva en un incremento significativo de la duración de su vida. Parece ser que la proteína controla el desarrollo en etapas tempranas, y en etapas adultas controla el envejecimiento, cuando la proliferación celular deja de ser importante para el organismo.

¿Cómo funciona TOR?

Hay señales externas a las células que estimulan su crecimiento, como las hormonas, los nutrientes y la energía. La función de esta proteína es percibir esas señales y activar el metabolismo que induce el crecimiento. Por ejemplo, la presencia de la insulina y los aminoácidos son percibidos por TOR y son utilizados como señales para indicar a la célula que tiene las condiciones adecuadas para crecer. La falta de aminoácidos le manifiesta lo contrario y, entonces, su crecimiento disminuye. Además, crecer consume grandes cantidades de energía para poder realizar los cambios metabólicos asociados con este proceso. Esta proteína también tiene la capacidad de percibir el nivel energético; así, si la célula no tiene suficiente energía para la síntesis de proteínas, la actividad de TOR disminuye, resultando en un decremento del crecimiento.

TOR y envejecimiento

Se ha observado que la restricción dietética (limitación de la ingesta de nutrientes) es un

fenómeno que prolonga la duración de la vida en algunos organismos, como ocurre en moscas, ratones y primates, lo cual sugiere que podría tener el mismo efecto en humanos. Al parecer, el consumo limitado de nutrientes reduce la actividad de la proteína TOR, lo cual podría prolongar la vida: quizá porque disminuye el metabolismo controlado por esta proteína. Este mismo efecto tiene la aplicación de fármacos que disminuyen su actividad; por lo tanto, parece ser que consumir bajas cantidades de nutrientes en etapas adultas resultaría en una extensión de la duración de la vida, a través de la disminución de la actividad de TOR.

TOR y enfermedades

Otro aspecto que fascina de esta proteína es su relación con algunas enfermedades, pues existen estudios que la vinculan con el desarrollo de enfermedades como la diabetes, la obesidad, algunas enfermedades neurodegenerativas y el cáncer. Lo anterior indica que tales padecimientos tienen origen, en parte, en desórdenes del control del crecimiento celular. En el caso del cáncer, eventos como las mutaciones de elementos que regulan el funcionamiento de TOR, resultan en una activación inapropiada de esta proteína, promoviendo la proliferación celular y el desarrollo de la enfermedad. De hecho, se ha reportado que entre 60 y 80% de todos los tipos de cáncer tienen incrementada la actividad de TOR.

Adicionalmente, el tratamiento con la rapamicina podría beneficiar a pacientes con desórdenes neurodegenerativos, porque éstos se agudizan con la progresión del envejecimiento. Si la rapamicina retarda el proceso de envejecimiento —por disminuir la actividad de TOR— se podría preservar por más tiempo el tejido nervioso en mejores condiciones de funcionamiento, y retrasar el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

TOR en plantas

En plantas, el estudio de la proteína TOR ha sido difícil, debido a la escasez de herramientas bioquímicas y moleculares. Durante los primeros estudios realizados con la planta *Arabidopsis thaliana* —utilizada como modelo de estudio— se encontró que la ausencia de TOR es mortal para la planta. Además, se observó una insensibilidad a la rapamicina (el fármaco que inhibe la actividad de TOR), dificultando el estudio de esta proteína en las plantas; sin embargo, se han hecho esfuerzos notables para conocer su función. Recientemente se generaron diferentes enfoques para abordar este tema. La combinación de plantas mutantes e inhibidores específicos han ayudado a conocer algunas funciones de TOR durante el ciclo de vida de las plantas.

Estos estudios han mostrado que, a pesar de las diferencias entre plantas y animales, la función de TOR es similar en ambos tipos de organismos, pues su expresión se localiza en zonas donde hay mayor división celular. Además, su actividad es estimulada por nutrientes como la glucosa y hormonas vegetales para controlar la formación de hojas, flores, semillas y raíz.

A nivel molecular, estimula la producción de proteínas, la división celular y el metabolismo; sin embargo, el mecanismo por el que regula estos procesos y los componentes involucrados es diferente entre ambos organismos, ya que muchas proteínas implicadas en esta función, en sistemas animales, no se encuentran en plantas.

El papel de TOR en las plantas apenas se está empezando a dilucidar y es todo un reto para los investigadores enfocados en este campo; su estudio en organismos fotosintéticos es relativamente nuevo y puede ofrecer nuevos conocimientos sobre el crecimiento de las plantas. Los resultados obtenidos

podrían ayudarnos a entender mejor la biología vegetal, además de aplicar estos conocimientos para mejorar cultivos de importancia económica; por ejemplo: se han generado plantas con una alta expresión de la proteína TOR que son resistentes a la sequía y, por lo tanto, resultan prometedoras para la agricultura.

Glosario:

TOR. Proteína llamada "Target of Rapamycin".

Genoma. Es la cantidad total del material genético de una célula.

Vía metabólica. Es una serie de reacciones químicas consecutivas que ocurren dentro de la célula, para formar un producto metabólico.

Referencias bibliográficas

1. Björklund M. 2018. "Cell Size Homeostasis: Metabolic Control of Growth and Cell Division". *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Article in Press.
2. Blenis J. 2017. "TOR, the Gateway to Cellular Metabolism. Cell Growth and Disease". *Cell*. 171:10-13.
3. Kierzkowski D, Routier-Kierzkowska AL. 2019. "Cellular Basis of Growth in Plants: Geometry Matters". *Current Opinion in Plant Biology*. 47:56-63.
4. Tuck S. 2014. The Control of Cell Growth and Body Size in *Caenorhabditis Elegans*. *Experimental Cell Research*. 32:171-176.
5. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. 2006. TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell*. 124:471-484.

CONACYT

Av. Insurgentes Sur 1582, Col. Crédito Constructor • Alcaldía. Benito Juárez C.P: 03940, México, CDMX Tel: (55) 5322-7700
Comentarios, sugerencias y dudas sobre este sitio de internet y sus sistemas:
Centro de Contacto y Soporte Técnico

DERECHOS RESERVADOS © 2019
Políticas de Privacidad

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

En la ciudad de Morelia, Michoacán, siendo las 12:00 horas del día 9 de febrero de 2018 se reunieron en las instalaciones de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, los C.C. sinodales MIGUEL MARTINEZ TRUJILLO, ERNESTO GARCIA PINEDA, MARIA ELENA GRANADOS GARCIA, Presidente y Vocales respectivamente del jurado designado para practicar el examen profesional para obtener el título de **Biólogo,** concedido en oficio número 212090218086544 de fecha 11 de Diciembre de 2017, expedido por la Dirección de Control Escolar de la propia Universidad a ARTURO CHAVEZ VALENZUELA con matrícula 0802728B quien nació el día 26 de Agosto de 1988 en el municipio de Huetamo del estado de Michoacán y Clave Única de Registro de Población CAVA880826HMNHLR03, bajo la modalidad de Tesis presentando el trabajo titulado: "EFECTOS DE MUTANTES EN LA PRODUCCIÓN DE POLISACÁRIDOS DE Azospirillum brasilense (exoC y rmLD) SOBRE EL DESARROLLO DE Arabidopsis thaliana.", por lo que el día y hora señalados, el jurado procedió a practicar el EXAMEN ORDINARIO correspondiente, conforme a las disposiciones reglamentarias vigentes. Una vez concluida la evaluación, los integrantes de la mesa sinodal deliberaron sobre la capacidad e idoneidad del sustentante acordando **APROBARLO POR UNANIMIDAD DE VOTOS,** lo cual se comunicó al sustentante. Acto continuo, el Presidente del Jurado procedió a tomarle la protesta en los siguientes términos: *"¿Protesta conducirse con toda honradez y moralidad en el ejercicio de su profesión, teniendo siempre presente los elevados fines con los que la Universidad ha instituido esta carrera y de que la misma tiene un carácter eminentemente social; así como normar su conducta, de acuerdo a los principios filosóficos sustentados por esta Máxima Casa de Estudios en el desarrollo de sus actividades?"* contestando el sustentante *"SÍ PROTESTO"*. Una vez hecho lo anterior se levanta la presente acta, siendo las 13:17 horas del día de su fecha, firmando en señal de legal y debida constancia de quienes en ella intervinieron, asistidos de MARIA GLORIA SOLIS GUZMAN en su carácter de Secretaria de la dependencia en que se celebra el presente examen Profesional quien autoriza y da fe.

CAVA880826HMNHLR03

212090218086544

EXAMEN PROFESIONAL

PRESENTADO POR

ARTURO CHAVEZ VALENZUELA

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Biólogo

MIGUEL MARTINEZ TRUJILLO
Presidente del Jurado

ERNESTO GARCIA PINEDA
Vocal

MARIA ELENA GRANADOS GARCIA
Vocal

ARTURO CHAVEZ VALENZUELA
Sustentante

MARIA GLORIA SOLIS GUZMAN
Secretaria

SMB OLLIN ®

La Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C.

FUNDADA EN 1957

Atendiendo al mérito de Manuel Méndez Gómez

y a los servicios que ha prestado a la ciencia, tuvo a bien admitirlo en su seno como

Miembro Estudiante

El día 08 de mayo del 2019 *y para constancia le extiende el presente diploma.*

Ciudad de México

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro
Presidente

Dr. Jorge Luis Folch Mallol
Secretario

Ciudad de México a 14 de marzo de 2020

Estimado Manuel Méndez Gómez

Por medio de estas líneas le doy una cordial bienvenida a la Sociedad Mexicana de Astrobiología, A.C., SOMA.

La Sociedad Mexicana de Astrobiología A.C. se constituyó en noviembre del año 2000. Los objetivos son impulsar la investigación, cooperación académica, divulgación y formación de recursos humanos en Astrobiología y disciplinas relacionadas. La Sociedad organiza un Congreso Nacional de Astrobiología, así como la Escuela de Astrobiología, ambos eventos tienen una periodicidad bianual y se llevan a cabo de manera anual alternada. Como miembro de SOMA, usted tiene el beneficio de no pagar inscripción al Congreso y, bajo igualdad de circunstancias, se le da preferencia respecto a otros estudiantes que soliciten participar en la Escuela de Astrobiología. SOMA también organiza o participa en eventos de divulgación tales como "El encuentro con la Tierra", "La noche de las estrellas" y "El día del asteroide", a los que la invitamos a participar.

Los estudiantes afiliados a SOMA forman parte de un consejo estudiantil en el que pueden opinar y proponer actividades a la mesa directiva de la Sociedad. Por su parte, la mesa directiva toma sinceramente en cuenta las inquietudes de los miembros-estudiantes.

Sin más por el momento, agradezco su atención y la invito a que participe en las distintas actividades académicas y de divulgación que la Sociedad Mexicana de Astrobiología, A.C. organiza o participa. Estoy segura que sus aportaciones enriquecerán las labores de la Sociedad.

Atentamente.

Antígona Segura

Dra. Antígona Segura Peralta
Presidenta de SOMA