



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE PLANTAS

**Efecto de los lipopolisacáridos de *Azospirillum baldaniorum*
Sp245 en la función de la fosfolipasa D y la proteína TOR en
plantas de *Arabidopsis thaliana***

Tesis que presenta:

M. C. Alma Alejandra Hernández Esquivel

Para obtener el grado de:

Doctora en ciencias en Biología Experimental

Director de tesis:

D. C. Ernesto García Pineda

Morelia, Michoacán, junio 2025



Esta investigación 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 dirección del D. C. Ernesto García Pineda. Para su desarrollo se contó con el apoyo económico de la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) con el número de beca 606505.



AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por el apoyo económico otorgado para la realización de esta investigación.

A mi asesor de tesis, el Dr. Ernesto García Pineda, por aceptarme en su laboratorio y ser parte de su grupo de trabajo; por guiar esta investigación con disciplina, paciencia y amabilidad. Gracias también por sus consejos y sus enseñanzas para mejorar como persona y desenvolverme en la investigación.

A mi comité sinodal, los doctores en ciencias: José López Bucio, Eduardo Valencia Cantero, Homero Reyes de la Cruz y Saúl Fraire Velázquez, por el tiempo que me regalaron en cada seminario de evaluación, por las observaciones y aportes para mejorar esta investigación. Además de los equipos y materiales prestados.

A la M. C. Elda Castro Mercado por aceptarme en su laboratorio, por sus aportaciones al desarrollo de las técnicas aplicadas en esta investigación, por su paciencia, sus charlas y sus consejos de vida.

A mis padres, Gerardo Hernández Romero y Ángela Esquivel Baena por todo su amor, apoyo, valores, y por incluirme en sus oraciones para que me vaya bonito en la vida.

A toda mi familia, Jean, Richi, Lalo, Robert, Vero, Angie, Alo, Fredy, por su compañía y amor incondicional.

A mi hija Athena por toda su paciencia, por regalarme de su tiempo, por acompañarme al laboratorio y por todo su amor.

A Josafat Calderón por todo su amor, su precioso tiempo y apoyo.

Al M. C. Luis María Suarez por su amistad, por su generosidad y por el préstamo de equipos y reactivos de laboratorio.

A la D. C. Idolina Flores Cortez, por su amistad, por toda su ayuda, enseñanza y paciencia para el desarrollo del RT-qPCR.

A mis amigas, Kirán, Eli y Mandi (mi Befi) por acompañarme en los días malos, pero también en los muchos momentos agradables del posgrado, por brindarme su amistad sincera.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Beto, Chevo, Fani Irepan, Fanny Eunice, Elvira, Yasmín y Chantal por todo lo que me han enseñado, por su amistad y compañerismo.

A mis amigos del instituto, Artur, Donovan, Uber, Adrián, Fer, Aimé y Mitzi por su amistad, ayuda y compañía.

A Alejandra Escudero y a Susana Montoya Huerta por su amistad, orientación y acompañamiento en este proceso.

A todas las personas que contribuyeron de manera indirecta al desarrollo de esta investigación, ¡gracias, gracias, gracias!

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
2. INTRODUCCIÓN.....	5
3. ANTECEDENTES.....	8
3. 1. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)	8
3.1.1. Mecanismos de estimulación del crecimiento vegetal de las PGPR.....	8
3.1.2. Las PGPR como bioinoculantes	9
3.2. Características del género <i>Azospirillum</i>	9
3.2.1. <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp245.....	11
3.3. Lipopolisacáridos	12
3.3.1. Estructura de los lipopolisacáridos.....	13
3.3.2. Los lipopolisacáridos de <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp245	14
3.3.3. Receptores de lipopolisacáridos en plantas.....	14
3.3.4. Respuestas de las plantas a los lipopolisacáridos	15
3.4. Las fosfolipasas en plantas	18
3.4.1. La fosfolipasa D en plantas.....	19
3.4.2. La fosfolipasa D en <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
3.4.3. Funciones de las PLD en <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
3.4.3.1. Respuesta al estrés abiótico	22
3.4.3.2. Respuesta a nutrientes	24
3.4.3.3. Funciones celulares y de desarrollo.....	25
3.4.3.4. Participación en la interacción planta-bacteria.....	26
3.4.4. Regulación de la PLD	27
3.4.5. Inhibidores de la señalización de la PLD	28
3.4.6. Síntesis de fosfatidilcolina.....	29
3.4.7. Vías de producción de ácido fosfatídico	30
3.4.8. El ácido fosfatídico como segundo mensajero.....	32
3.5. La Proteína Blanco de la Rapamicina (TOR)	33
3.5.1. Complejos de la proteína TOR	34
3.5.2. Componentes río arriba de la ruta TOR en plantas	35

3.5.3. Componentes río debajo de la ruta TOR en plantas.....	36
3.5.4. Activación de mTOR por el Ácido fosfatídico.....	39
3.5.5. Participación de TOR en el desarrollo de las plantas	40
4. JUSTIFICACIÓN.....	42
5. HIPÓTESIS.....	43
6. OBJETIVOS.....	43
6.1. OBJETIVO GENERAL	43
6.1.1. OBJETIVOS PARTICULARES	43
7. RESULTADOS	44
7.1. CAPÍTULO 1. Phospholipase D is required for the activation of target of rapamycin (TOR) signaling in <i>Arabidopsis thaliana</i> by lipopolysaccharides from <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp24.....	45
7.2. CAPÍTULO 2. Hydrogen peroxide modulates the expression of the target of rapamycin (TOR) and cell division in <i>Arabidopsis thaliana</i>	90
7.3. CAPÍTULO3. RESULTADOS ADICIONALES	102
7.3.1. La inoculación con <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp245 promueve la acumulación de ácido ascórbico, y disminuye la expresión de la cinasa TOR y la división celular en la raíz de <i>Arabidopsis</i>	102
7.3.2. Lipopolisacáridos: Moléculas clave en las interacciones bacterianas.	113
7.3.3. Molecular Signals and Elicitors in <i>Azospirillum</i> -Plant Interactions.....	119
7.3.4. PLD α 1 improves saline stress tolerance in <i>Arabidopsis thaliana</i> inoculated with <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp245.....	158
7.3.5. The growth promotion of <i>Arabidopsis thaliana</i> by <i>Serratia</i> Sp. H6 requires the metabolic stress sensor SNF1-related protein kinase 1 (SnRK1).....	168
7.3.6. Participación de diferentes isoformas de PLD en la bioestimulación de <i>Arabidopsis thaliana</i> por los LPS.....	177
8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	181
9. LITERATURA CITADA	184
10. APÉNDICE	207
Protocolo 1. Extracción de lipopolisacáridos de <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp245.....	207
Protocolo 2. Extracción de lípidos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	211
Protocolo 3. Cromatografía de capa fina para lípidos	213
Protocolo 4. Ensayo histoquímico para la β -glucuronidasa (GUS).	215
Protocolo 5. Extracción de ARN de <i>Arabidopsis thaliana</i> con TRIzol	217

Protocolo 6. Síntesis de ADNc a partir de ARN de <i>Arabidopsis thaliana</i>	219
Protocolo 7. Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cuantitativa (RT-qPCR).	221
Protocolo 8. Detección de H ₂ O ₂ en <i>Arabidopsis thaliana</i> con DAB.....	223
Protocolo 9. Ensayo de la viabilidad celular en <i>Arabidopsis thaliana</i>	224

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del lipopolisacárido.	13
Figura 2. Estructura de los dominios de las dos subfamilias de PLD en <i>Arabidopsis</i>	21
Figura 3. Funciones de las PLD.	22
Figura 4. Reacción de hidrólisis y transfosfatilación por la fosfolipasa D.	29
Figura 5. Vías de biosíntesis del ácido fosfatídico (AF).....	31
Figura 6. Estructura de los complejos de la proteína TOR.	34
Figura 7. Vía de señalización de AtTOR.	38
Figura 8. Comparación del crecimiento de plantúlas de las diferentes isoformas de PLD.	177
Figura 9. Comparación en los parámetros de crecimiento.	178
Figura 10. Comparación del efecto de los LPS en el desarrollo de los pelos radiculares de las diferentes isoformas de PLD.	179
Figura 11. Producción de ácido fosfatídico en las diferentes líneas de PLD.....	180

1. RESUMEN

Los lipopolisacáridos (LPS) son moléculas que forman parte de la estructura de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Su ubicación es clave en la interacción de las bacterias con otros organismos, actuando como moléculas de señalización. La percepción de los LPS desencadena respuestas de defensa tanto en animales como en plantas. No obstante, se ha observado que los LPS provenientes de bacterias benéficas participan en la estimulación del crecimiento vegetal. Recientemente, en *Arabidopsis thaliana*, se reportó que los LPS de la rizobacteria *Azospirillum baldaniorum* Sp245 estimulan el crecimiento de las plantas y activan a la proteína cinasa TOR (Target Of Rapamycin), la cual regula el crecimiento y el desarrollo celular. Sin embargo, se desconocen los elementos moleculares río arriba que participan en la activación de TOR por los LPS.

En esta investigación se propuso a la fosfolipasa D (PLD), una enzima encargada de hidrolizar fosfolípidos estructurales de la membrana plasmática, como un posible mediador de la activación de TOR por los LPS, a través de la producción de ácido fosfatídico (AF), un segundo mensajero que participa en vías de señalización del desarrollo, por lo que el objetivo de este estudio fue investigar el efecto de los lipopolisacáridos de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 en la actividad de la PLD y su conexión con la vía de señalización de TOR en el crecimiento en *Arabidopsis thaliana*.

Un análisis espectrofotométrico reveló que el tratamiento con LPS (100 µg/mL) incrementó la actividad de la PLD en *Arabidopsis thaliana* a partir de los 5 minutos, siendo más pronunciada a los 30 minutos. La evaluación del contenido de AF mediante cromatografía de capa fina mostró un incremento en su producción en plántulas tratadas con LPS, en concordancia con la actividad de la PLD. La acumulación de AF inducida por LPS fue inhibida por 1-butanol, un inhibidor conocido de la PLD. Notablemente, los LPS no estimularon el crecimiento de la línea mutante *xipot1*, deficiente en la biosíntesis de fosfocolina, un precursor esencial para la producción de AF. La expresión del reportero de TOR en los meristemos, visualizada en plantas transgénicas TOR::GUS, también se incrementó con el tratamiento de LPS, efecto que fue atenuado por 1-butanol.

Por otra parte, la aplicación exógena de diversas especies de AF (di16:0-AF, di18:0-AF y di18:1-AF) elevó la expresión de TOR en los meristemos, destacando el AF insaturado (di18:1-AF) por su mayor efecto. Mediante RT-qPCR, se determinó que los LPS aumentan la expresión de los genes ribosomales *RPS27B* (Proteína de la subunidad ribosómica pequeña 27B) y *RPL7B* (Proteína de la subunidad ribosómica grande L7B), pero no de *RPS6B* (Proteína ribosómica 6S). El análisis del reportero de la división celular CYCB1;1::GUS en el meristemo de la raíz, demostró que las diferentes especies de AF estimulan su expresión, siendo el AF di18:1-AF el más efectivo. En conjunto, estos resultados resaltan el papel de la actividad de PLD como modulador de la señalización de TOR en *Arabidopsis thaliana* en respuesta a los LPS de *Azospirillum baldaniorum* Sp245.

Palabras clave: Rizobacteria, lipopolisacáridos, Target of Rapamycin, ácido fosfatídico, 1- butanol, división celular, proteínas ribosomales, meristemos.

ABSTRACT

Lipopolysaccharides (LPS) are molecules that form part of the outer membrane of Gram-negative bacteria. Their strategic location plays a crucial role in bacterial interactions with other organisms, acting as signaling molecules. The recognition of LPS triggers defense responses in both animals and plants. However, LPS derived from beneficial bacteria have also been shown to promote plant growth.

Recently, it was reported that in *Arabidopsis thaliana*, LPS from the rhizobacterium *Azospirillum baldaniorum* Sp245 stimulates plant growth and activates the protein kinase TOR (Target of Rapamycin), a key regulator of cell growth and development. Although the upstream elements involved in TOR activation by LPS remain unknown, this study proposed phospholipase D (PLD), an enzyme responsible for hydrolyzing structural phospholipids in the plasma membrane, as a potential mediator of TOR activation by LPS through the production of phosphatidic acid (PA), a second messenger involved in developmental signaling pathways.

This study aimed to investigate the effect of lipopolysaccharides from *Azospirillum baldaniorum* Sp245 on PLD activity and its connection to the TOR signaling pathway during growth promotion in *Arabidopsis thaliana*. Spectrophotometric analysis of PLD activity in *Arabidopsis thaliana* revealed that treatment with LPS (100 µg/mL) induced a detectable increase in activity starting at 5 minutes, with the highest levels observed at 30 minutes. Thin-layer chromatography confirmed that LPS-treated seedlings exhibited elevated phosphatidic acid (PA) levels, consistent with increased PLD activity. This LPS-induced PA accumulation was suppressed by 1-butanol, a known PLD inhibitor. Notably, LPS treatment did not promote growth in the *xipot1* mutant line, which is deficient in phosphocholine biosynthesis, an essential precursor for PA production. In TOR::GUS transgenic plants, TOR expression in meristems was enhanced by LPS treatment, an effect that was attenuated in the presence of 1-butanol. Furthermore, exogenous application of different PA species (di16:0-PA, di18:0-PA, and di18:1-PA) increased TOR expression, with unsaturated PA (di18:1-PA) being the most effective. RT-qPCR analysis showed that LPS treatment upregulated the expression of ribosomal genes

RPS27B (small ribosomal subunit protein 27B) and RPL7B (large ribosomal subunit protein L7B), but not RPS6B (6S ribosomal protein). Finally, analysis of cell division in the root meristem using the CYCB1;1::GUS reporter line demonstrated that various PA species stimulated TOR-dependent cell division, with di18:1-PA showing the strongest effect. Collectively, these results underscore the role of PLD activity as a modulator of TOR signaling in *Arabidopsis thaliana* in response to LPS from *Azospirillum baldaniorum* Sp245.

Keywords: Rhizobacteria, lipopolysaccharides, Target of Rapamycin, phosphatidic acid, 1-butanol, cell division, ribosomal proteins, meristems.

2. INTRODUCCIÓN

Las plantas coexisten con una gran variedad de bacterias, hongos y otros microorganismos que constituyen su microbiota. Estas comunidades microbianas son particularmente importantes para la salud de la planta ya que influyen en su desarrollo y su productividad (Floc'h et al., 2020). Las interacciones planta-microorganismo ocurren primordialmente en la rizosfera, definida como la porción del suelo influenciado por las raíces de las plantas o en asociación con las raíces (Bhattacharyya y Jha, 2012).

Las plantas modulan la composición de su microbiota, liberando compuestos de señalización que atraen especies específicas mediante quimiotaxis (Backer et al., 2018). Entre estas especies destacan las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR; Plant Growth Promoting Rhizobacteria), que impactan positivamente en el crecimiento de las plantas de forma directa, mediante la producción de fitohormonas o la facilitación de la absorción de nutrientes, o de forma indirecta, al mitigar o prevenir los efectos perjudiciales de fitopatógenos (Beneduzi et al., 2012).

Azospirillum baldaniorum Sp245 (anteriormente clasificada como *Azospirillum brasilense* Sp245) es una rizobacteria ampliamente utilizada en el estudio de la promoción del crecimiento vegetal (Cassán y Diaz-Zorita, 2016; Dos Santos Ferreira et al., 2020). Entre sus características se encuentran su capacidad para la fijación de nitrógeno atmosférico y la producción de compuestos benéficos para las plantas, principalmente fitohormonas como las auxinas. A nivel estructural, se clasifica como una bacteria Gram-negativa, un grupo caracterizado por la presencia de una doble membrana en su envoltura celular (membrana interna y membrana externa).

La membrana externa, además, contiene lipopolisacáridos (LPS) anclados en su superficie. Estas moléculas comparten una estructura común con tres regiones: el lípido A, formado por D-glucosamina fosforilada unida por enlaces β (1 $\rightarrow$ 6) y esterificada con ácidos grasos (Molinaro et al., 2009; Silipo y Molinaro, 2011), el oligosacárido central o core, es una cadena corta de hexosas y heptosas, que además incluye a el ácido 2-ceto-3-deoxioctulosónico (KDO), y el antígeno O que

se encuentra compuesto por repeticiones de oligosacáridos de hasta cinco monosacáridos. Cada región que constituye al LPS suele presentar variaciones en su composición entre las distintas especies bacterianas. Dada su posición superficial, el LPS puede interactuar con diversos organismos, lo que le permite participar en la interacción planta-bacteria (Silipo y Molinaro, 2011).

Los LPS de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 ejercen efectos positivos en el desarrollo del trigo (*Triticum aestivum*). Evseeva et al. (2011) reportaron que el tratamiento con LPS (10 µg/mL) incrementó el índice mitótico de células en el meristemo radicular, con aumentos comparables a los observados tras la inoculación con la bacteria completa. También se demostró la capacidad de estas moléculas para mejorar la actividad morfogenética de los tejidos somáticos (Evseeva et al., 2018). En estudios previos por nuestro grupo de trabajo, se observó que tanto en invernadero como *in vitro*, el tratamiento con LPS a plantas de trigo promovió un aumento en la longitud de la lámina foliar y de la raíz, incrementó el peso fresco y la formación temprana de espigas (Chavéz-Herrera et al., 2018; Hernández-Esquivel et al., 2020). A nivel bioquímico, se observó un incremento dosis-dependiente en la actividad de la enzima peroxidasa (POX), la producción de especies reactivas de oxígeno y la disponibilidad de Ca²⁺ (Hernández-Esquivel et al., 2020), lo que sugiere que las plantas pueden reconocer a los LPS de bacterias benéficas. Recientemente se reportó que los LPS de *Azospirillum baldaniorum* Sp24 activan la vía de señalización TOR (Target Of Rapamycin) en *Arabidopsis*, aumentando la expresión de esta proteína en el meristemo radicular, así como la fosforilación de la cinasa ribosomal S6K, un blanco regulado por TOR. Estos efectos fueron bloqueados por el inhibidor de TOR, AZD-8055 (Méndez-Gómez et al., 2020). TOR es una proteína cinasa conservada que regula procesos celulares fundamentales en respuesta a señales ambientales. Si bien se ha demostrado una conexión entre los LPS y TOR, el mecanismo específico por el cual los LPS activan esta vía de señalización aún no se conoce.

En las interacciones entre la planta con sus microorganismos benéficos, la membrana celular de las células vegetales es el primer punto de percepción e inicio

de la estimulación metabólica para el crecimiento inducido por rizobacterias. Los fosfolípidos, componentes estructurales principales de la membrana, se hidrolizan por fosfolipasas, enzimas esenciales para el crecimiento y desarrollo vegetal (Frank et al., 2000; Zien et al., 2001). En plantas, las fosfolipasas se agrupan en tres grupos: la fosfolipasa A (PLA), la fosfolipasa C (PLC) y la fosfolipasa D (PLD), con base en la actividad catalítica que realizan (Zien et al., 2001).

La PLD cataliza la hidrólisis de fosfolípidos para producir ácido fosfatídico (AF), un lípido mensajero implicado en el crecimiento y la proliferación celular (Hong et al., 2008). En *Arabidopsis thaliana*, la familia de las PLD comprende 12 isoformas caracterizadas: PLD α (1, 2 y 3), β (1 y 2), γ (1, 2 y 3), ϵ y ζ . Estas isoformas se clasifican con base en su secuencia, su estructura proteica, sus propiedades notables en la regulación de la actividad y su preferencia por fosfolípidos (Ali et al., 2022). La producción de AF por la PLD, desempeña una función importante en el crecimiento, desarrollo y respuestas de las plantas a diversos tipos de estrés, como sequía, salinidad, heladas y deficiencia de nutrientes. Este lípido mensajero influye en procesos celulares a través de diferentes mecanismos, incluyendo la unión directa a proteínas diana y la modulación de las propiedades biofísicas de las membranas celulares (Li et al., 2009). En mamíferos, el AF producido por la PLD activa la vía de señalización de TOR (Fang et al., 2001). Mientras que en plantas la isoforma PLD α 3, en condiciones de estrés hiperosmótico y salino, incrementó los niveles de transcrito de TOR y estimuló la fosforilación de su blanco S6K, posiblemente por mediación de la producción de AF (Hong et al., 2008).

En esta investigación se analizó el efecto de los LPS de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 sobre la actividad de la PLD y su relación con la proteína TOR en la promoción del crecimiento de *Arabidopsis thaliana*, con la finalidad de profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en los efectos benéficos de esta rizobacteria. Los resultados obtenidos indican que la actividad de la enzima PLD es necesaria para la modulación de la vía de señalización de TOR en *Arabidopsis thaliana* en respuesta a los LPS de *Azospirillum baldaniorum* Sp245.

3. ANTECEDENTES

3. 1. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)

El uso de bacterias para promover el crecimiento vegetal se remonta a la antigüedad, mucho antes de su descubrimiento por Anton van Leeuwenhoek en 1683. Teofrasto (372-287 a. C.), considerado por Carlos Linneo como el “padre de la botánica”, recomendaba la mezcla de suelos para mejorar su calidad, lo que sugiere un aprovechamiento intuitivo de los microorganismos. Más tarde, en 1888, Hellriegel y Wilfarth demostraron que las bacterias de la rizosfera de gramíneas y leguminosas pueden convertir el nitrógeno atmosférico en formas disponibles para las plantas (Bhattacharyya y Jha, 2012). En 1978 Kloepper y Schroth acuñaron el término PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) para designar al grupo de bacterias presentes en la rizosfera que tienen la capacidad de mejorar la salud y el crecimiento de las plantas (Kloepper y Schroth, 1978; Montaña et al., 2014).

Según su ubicación, las PGPR se dividen en iPGPR (intracelulares) o endófitas y ePGPR (extracelulares) o de vida libre. Las iPGPR, colonizan los tejidos internos de las plantas sin causar daño, algunas pueden formar nódulos o estructuras especializadas. Las ePGPR, en cambio, viven fuera de las células vegetales, no forman nódulos, pero promueven el crecimiento de las plantas (Cheng et al., 2010; Ghosh et al., 2024). Además, por sus funciones, las PGPR se clasifican en cuatro tipos: biofertilizantes (mejoran los nutrientes), fitoestimulantes (ayudan al crecimiento con hormonas), rizadorremediadores (limpian contaminantes orgánicos) y biopesticidas (controlan enfermedades con antibióticos y antifúngicos) (Ghosh et al., 2024).

3.1.1. Mecanismos de estimulación del crecimiento vegetal de las PGPR

Las PGPR influyen en el crecimiento de las plantas a través de mecanismos directos bien documentados, como la fijación del nitrógeno atmosférico, la solubilización del fosfato, la producción de hormonas de crecimiento (auxinas, citocininas y giberelinas), la producción de la enzima ACC desaminasa (que reduce el estrés en las plantas) y la síntesis de sideróforos (moléculas que ayudan a la planta a obtener hierro y dificultan el crecimiento de patógenos). Además, tienen mecanismos indirectos que se definen como las actividades inhibitorias que las bacterias

promotoras del crecimiento ejercen cuando impiden el efecto negativo de los organismos patógenos (estrés biótico). Algunos de los mecanismos indirectos más comunes son la producción de cianuro de hidrógeno, antibióticos y enzimas degradativas que dañan la pared celular de los patógenos (Vocciante et al., 2022).

3.1.2. Las PGPR como bioinoculantes

Las PGPR representan una herramienta prometedora para la agricultura sostenible y la salud de los ecosistemas, ofreciendo beneficios para mejorar el crecimiento de las plantas, la absorción de nutrientes y la resistencia a enfermedades. Su uso ayuda a disminuir la necesidad de fertilizantes y pesticidas químicos, promoviendo prácticas agrícolas ecológicas. Sin embargo, su aplicación exitosa se enfrenta a desafíos como la variabilidad de su efectividad según la planta y el entorno, así como la competencia con los microorganismos nativos del suelo, lo que exige una comprensión profunda de sus interacciones complejas para asegurar resultados consistentes y fiables (Ghosh et al., 2024).

Entre las PGPR, el género *Azospirillum* destaca como el más estudiado. Su relevancia mundial se consolidó en la década de 1970, convirtiéndose en el principal inoculante comercial para varios cereales (Fernandes et al., 2020; Pedraza et al., 2020). La inoculación con *Azospirillum* puede disminuir el uso de fertilizantes nitrogenados, generando un ahorro estimado de 30 a 50 kg/ha de nitrógeno (N) en el cultivo de maíz (Fernandes et al., 2020). Diversas investigaciones respaldan el éxito de *Azospirillum* como inoculante, con ganancias de productividad que oscilan entre el 5% y el 36% (García-Olivares et al., 2007; Askary et al., 2009; Islam et al., 2012). A continuación, se describirán algunos aspectos relevantes de este género.

3.2. Características del género *Azospirillum*

El género *Azospirillum* se clasifica dentro de la subclase α -proteobacterias que pertenecen a la familia *Rhodospirillaceae* (Baldani y Baldani, 2005). En 1925 Beijerinck observó por primera vez a una bacteria similar a un espirilo capaz de aumentar el contenido de nitrógeno en medios deficientes de nitrógeno a base de malato que nombró *Azotobacter largimobile*, posteriormente esta bacteria fue renombrada como *Spirillum lipoferum* (Cassán et al., 2020). Tras un largo periodo

de escasa atención, en 1974, Johana Döbereiner y colaboradores lograron aislar a esta bacteria de diversas gramíneas y muestras de suelos. Un estudio taxonómico detallado de 61 aislados llevó a la descripción del género *Azospirillum* con dos especies principales: *A. lipoferum* y *A. brasilense*. El aislamiento de estas bacterias se realizó utilizando un medio semisólido libre de nitrógeno con una pequeña cantidad de extracto de levadura, llamado medio NFb (Nitrogen Free broth) (Baldani y Baldani, 2005; Reis et al., 2015).

La descripción de nuevas especies de *Azospirillum* experimentó un incremento exponencial con el tiempo. La adopción de la formulación del medio NFb por otros grupos de investigación facilitó el descubrimiento de especies y géneros adicionales, revelando así nuevas interacciones de estas bacterias con diversas plantas (Reis et al., 2015). En 2014, una reclasificación del género *Azospirillum* condujo a la creación de dos nuevos géneros: *Niveispirillum* y *Nitrospirillum*. Como resultado, *A. irakense* fue transferida al género *Niveispirillum* (denominándose *Niveispirillum irakense*) y *A. amazonense* al género *Nitrospirillum* (*Nitrospirillum amazonense*) (Lin et al., 2014). Actualmente, se conocen un total de 22 especies pertenecientes a *Azospirillum* (Cassán et al., 2020).

Las bacterias de este género se caracterizan por su morfología espiral o ligeramente curvada, con forma de bastón. Son Gram-negativas, no forman esporas y presentan una notable movilidad gracias a un único flagelo polar y múltiples flagelos laterales de menor longitud (Pedraza et al., 2020). Su temperatura de crecimiento varía entre 20 y 38 °C (Dos Santos Ferreira et al., 2020). Su composición lipídica revela una abundancia significativa del ácido graso C18:1 (55.3%), siendo también relevantes 16:1 y 16:0, así como los ácidos grasos hidroxilados 3-OH C14:0 y 3-OH C16:0 (Pedraza et al., 2020).

Azospirillum manifiesta un metabolismo de carbono y nitrógeno flexible que le confiere una ventaja competitiva en la colonización de la rizósfera. Su capacidad para habitar tanto la superficie como el interior de las raíces, especialmente en la zona de elongación y la zona de formación de los pelos radicales, justifica su denominación como diazotrofos endófitos facultativos. En el entorno de la rizósfera,

establecen colonias tanto en la capa de mucigel que rodea las raíces (colonización externa) como en los espacios intercelulares del tejido radicular (colonización interna) (Fernandes et al., 2020). La asociación de *Azospirillum* confiere beneficios directos en las plantas como la fijación de nitrógeno (entre 20 y 40 kg N/ha en la rizosfera), la síntesis de hormonas, como los indoles, principalmente el ácido indol-3-acético (AIA; Spaepen et al., 2008), y diversos tipos de giberelinas (GA) (Bottini et al., 2004) podrían desempeñar un papel importante. Estas fitohormonas alteran el metabolismo y la morfología de las plantas, lo que conduce a una mejor absorción de nutrientes minerales y agua, y, en consecuencia, promueven el crecimiento y la salud vegetal (Díaz y Ortegón, 2006; Bashan y de Bashan et al., 2010; Villa-Castro et al., 2014). Mediante una combinación de mecanismos no relacionados que operan bajo las condiciones ambientales o agrícolas que requiere el cultivo en ubicaciones específicas, la bacteria contribuye en la mitigación del estrés (sal, sequía, compuestos tóxicos, ambiente adverso) así como en el control biológico o reducción de la microflora patógena (Bashan y de Bashan et al., 2010).

3.2.1. *Azospirillum baldaniorum* Sp245

Azospirillum brasilense no solo fue una de las primeras especies en ser descritas dentro del género *Azospirillum*, sino que también se ha consolidado como la más estudiada. La cepa Sp245 se aisló de raíces de trigo (*Triticum aestivum* L.) y se le considera un modelo debido al conocimiento acumulado durante más de tres décadas (Reis et al., 2015; Cassán et al., 2020).

Dos Santos Ferreira et al. (2020) reclasificaron la cepa Sp245 de *Azospirillum brasilense*. Mediante análisis filogenéticos, genómicos, fenotípicos y fisiológicos de diversas cepas de *Azospirillum*, los autores propusieron que Sp245, junto con las cepas Vi22 y BR12001, constituyen una nueva especie, denominada *Azospirillum baldaniorum* en honor a los microbiólogos brasileños Dr. José Ivo Baldani y Dra. Vera Divan Baldani por sus contribuciones pioneras al conocimiento del género *Azospirillum*.

3.3. Lipopolisacáridos

Los lipopolisacáridos (LPS) son moléculas características de la superficie celular de las bacterias Gram negativas, incluyendo el género *Azospirillum*. Constituyen el componente mayoritario de dicha superficie, ocupando un poco más del 70% (Silipo et al., 2010), proporcionan estabilidad a la célula bacteriana y forman una cubierta que la protege de entornos hostiles. No solo es fundamental para la viabilidad bacteriana, sino que también contribuyen sustancialmente, tanto directa como indirectamente, a múltiples aspectos de las interacciones entre organismos (Kutchera y Ranf, 2018).

Estas moléculas se consideran componentes bioactivos asociados a patógenos o microbios (PAMP/MAMP) y son reconocido por los sistemas inmunes de organismos de diferentes reinos (Ranf 2016). Su descubrimiento ocurrió a finales del siglo XIX y, en sus inicios, se denominaron endotoxinas (Knirel y Valvano, 2011). Desde entonces los LPS han sido ampliamente estudiados, especialmente en bacterias de relevancia médica. En mamíferos, se sabe que la liberación del LPS en el torrente sanguíneo del huésped ocurre durante la reproducción bacteriana por fisión binaria o tras la muerte de las bacterias, como sucede con el uso de antibióticos. La liberación masiva de LPS puede desencadenar una respuesta inflamatoria sistémica severa y un shock séptico, que generalmente conduce a la falla multiorgánica y la muerte. En contraste, la presencia de LPS en bajas concentraciones estimula la inmunidad del huésped y puede fortalecer el sistema inmunitario. Estas dos reacciones drásticamente opuestas explican el continuo interés científico en estas moléculas (Caroff y Novikov, 2020). En plantas, también han sido observadas respuestas diferenciadas a los LPS según su origen bacteriano, lo que sugiere la activación de distintas vías de señalización celular (Evseeva et al., 2018; Hernández-Esquivel et al., 2020).

3.3.1. Estructura de los lipopolisacáridos

Los LPS son moléculas anfífilas compuestas de tres regiones (Figura 1). La primera, es una fracción altamente conservada llamada lípido A, está formada por dos unidades de D-glucosamina fosforiladas unidas y esterificadas con ácidos grasos. Esta región, altamente conservada, ancla el LPS en la membrana bacteriana y es responsable de la mayoría de los efectos biológicos de estas potentes moléculas como la patogénesis de infecciones por bacterias Gram negativas. La fracción del lípido A está unida a un oligosacárido central, conocido como *core* o núcleo a través de un azúcar desoxiácido, el ácido 2-ceto-3-desoxi-octulosónico (KDO) que es exclusivo de esta molécula. La región del núcleo es dividida en un núcleo interno (con KDO y heptosas), y un núcleo externo (con hexosas). La tercera fracción de las moléculas de LPS, denominada antígeno O o cadena O, está compuesta por unidades repetitivas de oligosacáridos que se extienden fuera de la bacteria. Es la región más variable del LPS, su variabilidad estructural define los serotipos bacterianos y es utilizada históricamente para identificar bacterias gramnegativas. Algunas bacterias presentan LPS sin antígeno O, por lo que se denominan lipooligosacáridos (LOS).

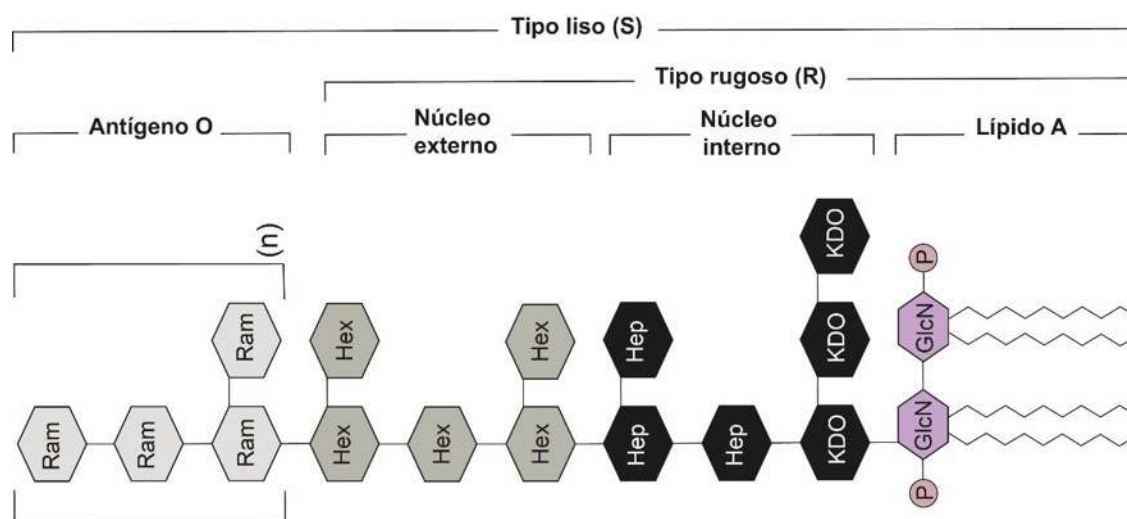


Figura 1. Estructura del lipopolisacárido.

GlcN: glucosamina; P: fosfato; KDO: ácido 2-ceto-3-desoxi-octulosónico; Hep: heptosas; Hex: hexosas; Ram: ramnosa. El azúcar constituyente del antígeno O varía entre especies bacterianas. Para el caso de *A. baumannii* Sp245 el antígeno O está conformado por repeticiones de ramnosa. Modificado de www.creative-biolabs.com.

Existen dos formas del LPS. La forma S (lisa) que incluye a las tres regiones (lípidos A, oligosacárido central y polisacárido O-específico), mientras que la forma R (rugosa) consiste únicamente de la región del lípidos A y del oligosacárido central o núcleo (Silipo y Molinaro, 2011; Sigida et al., 2013; Caroff y Novikov, 2020).

3.3.2. Los lipopolisacáridos de *Azospirillum baldaniorum* Sp245

El primer aislamiento de LPS en el género *Azospirillum* se reportó por Choma et al. (1984) quienes analizaron la estructura del LPS de *Azospirillum lipoferum* SpBr17. Sus hallazgos revelaron la producción de LPS de tipo S (caracterizado por sus tres regiones estructurales). Posteriormente, se detalló la región del lípidos A, la cual presenta ácido D-galacturónico en la posición C-1, residuos de 3-hidroxipalmitoil unidos a los grupos amino del disacárido, ácidos 3-hidroximirísticos esterificando los hidroxilos en C-3 y C-3', y ácidos grasos polares primarios parcialmente sustituidos por ácidos grasos no polares formando restos aciloxiacil, carece de residuos de fosfato, lo cual es una diferencia notable con el lípidos A enterobacteriano que contiene residuos de fosfato, una característica fuertemente asociada con la actividad endotóxica de las moléculas de LPS. Esta variación estructural sugiere una menor toxicidad del lípidos A de *Azospirillum* hacia células eucariotas (Choma y Komaniecka, 2008). Hasta el momento, este es el único reporte sobre la estructura del lípidos A en este género bacteriano. A pesar de ser la región más conservada del LPS, el lípidos A puede exhibir diversas modificaciones entre géneros e incluso dentro de especies del mismo género, particularmente en las sustituciones de fosfato y en el número, tipo y distribución de los ácidos grasos (Silipo y Molinaro, 2011). En la cepa de *Azospirillum baldaniorum* Sp245, únicamente se ha analizado la estructura del antígeno O, identificándose como un homopolímero lineal de D-ramnosa con la siguiente estructura:

β -D-RhapI(1→3)- α -D-RhapII-(1→3)- α -D-RhapIII-(1→3)- α -D-RhapIV-(1→3)- α -D-RhapV (Fedonenko et al., 2002).

3.3.3. Receptores de lipopolisacáridos en plantas

Las plantas detectan las diferentes regiones del LPS (Kutchera y Ranf, 2018). En *Arabidopsis thaliana*, se identificó el primer receptor para LPS, el cual es activado

tanto por el LPS completo como por su fracción del lipído A. Este receptor fue denominado LORE (LipoOligosaccharide-specific Reduced Elicitation). *AtLORE* se localiza en la membrana plasmática y pertenece a un grupo de proteínas cinasa transmembranales con un dominio S-lectina (SD1-RLK) (Ranf et al., 2015), que consta de 32 miembros en *Arabidopsis* (Shiu y Bleecker, 2003). *AtLORE* se requiere específicamente para la detección de preparaciones de LPS de *Pseudomonas* spp. y *Xanthomonas* spp., pero no de *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* o *Burkholderia* spp (Kutcher y Ranf, 2018).

Recientemente, se demostró en células en suspensión de cultivo de arroz (*Oryza sativa*) que *OsCERK1* (Chitin Elicitor Receptor Kinase 1), desempeña un papel fundamental en la percepción de LPS además de su papel documentado en la percepción de la quitina (Desaki et al., 2018). *CERK1* es una proteína de membrana plasmática que contiene tres motivos LysM (motivos de lisina) en el dominio extracelular y un dominio intracelular de cinasa Ser/Thr (serina/treonina). Los motivos LysM intervienen en el reconocimiento de oligosacáridos de quitina. En *Arabidopsis*, *AtCERK1* es esencial para la percepción de quitina (Miya et al., 2007).

Aunque *AtLORE* y *OsCERK1* representan los primeros componentes clave de la detección inmunitaria de LPS identificados en sistemas vegetales, actualmente se desconoce si estos receptores potenciales detectan LPS directamente y cómo se logra la especificidad de detección a nivel molecular (Kutcher y Ranf, 2018).

3.3.4. Respuestas de las plantas a los lipopolisacáridos

Se ha observado que en *Arabidopsis thaliana*, las preparaciones de LPS de *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* inducen la expresión de genes relacionados con la patogénesis (PR), específicamente *PR1* y *PR5*. Estos tratamientos también desencadenaron la acumulación de ácido salicílico (SA) libre y glucosídico tanto en hojas tratadas localmente como en hojas sistémicas. Lo que sugiere que los LPS contribuyen a la inducción de la resistencia sistémica adquirida (SAR), un fenómeno en el que una inoculación localizada de un patógeno induce resistencia a infecciones microbianas posteriores en toda la planta (Mishina y Zeier, 2007).

Los LPS de bacterias PGPR pueden inducir la resistencia sistémica inducida (ISR), un proceso que activa mecanismos de defensa en la planta, resultando en protección sistémica. Por ejemplo, se ha observado que el LPS de *Pseudomonas fluorescens* suprime la marchitez causada por *Fusarium* y mejora el rendimiento en plantas de rábano (Leeman et al., 1995). De manera similar, el LPS de *Rhizobium etli* G12 redujo significativamente la infección por el nematodo *Globodera pallida*, actuando como inductor de resistencia sistémica en las raíces de papa (Reitz et al., 2000).

Los LPS desencadenan diversos efectos en la inducción de la respuesta inmunitaria en plantas, incluyendo el estallido oxidativo, la producción de óxido nítrico (NO), la afluencia de calcio, la inducción de la expresión de genes *PR* y alteraciones de la pared celular que incluyen la deposición de callosa y compuestos fenólicos. Estas observaciones se han realizado con preparaciones de LPS de diversas bacterias utilizadas en cultivos de suspensión celular o en hojas de diversas plantas, lo que podría explicar algunas variaciones en los resultados (Erbs y Newman, 2012). Desaki et al. (2016) reportaron que las respuestas de defensa inducidas por LPS en células de arroz (una especie monocotiledónea modelo) están asociadas con la muerte celular programada (PCD), un hallazgo novedoso para el papel funcional de estas moléculas en células vegetales. También se sugiere la presencia de una maquinaria evolutivamente conservada que reconoce el LPS tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas.

Por otro lado, el antígeno O de muchas bacterias fitopatógenas se compone de cadenas ricas en L-ramnosa y se ha demostrado que oligo-ramnosas sintéticas que se asemejan a estos motivos de L-ramnosa inducen la expresión de genes *PR* en *Arabidopsis thaliana* (Bedini et al., 2005). Sin embargo, hasta la fecha, los componentes de la planta que median la detección del antígeno O, o del núcleo del LPS aún no han sido identificados (Kutcher y Ranf, 2018).

Además de su participación en la inducción de la defensa de las plantas, los LPS pueden participar en la estimulación del crecimiento vegetal. En plantas de trigo (*Triticum aestivum*) el tratamiento con LPS aislados de *A. brasilense* Sp245 (10

µg/mL) activó la división celular en el meristemo de raíces de trigo e incrementó la longitud y el peso fresco de las plantas, teniendo un efecto similar al observado con la inoculación de la bacteria *A. brasilense* Sp245 (Evseeva et al., 2011). Una respuesta similar fue observada en condiciones de invernadero donde la aspersión semanal con dos concentraciones de LPS de *A. brasilense* Sp245 (2 y 5 µg/mL) durante tres meses mejoró los parámetros de crecimiento como la elongación de hojas, el peso seco y la formación de espigas. Sin embargo, también acelera el envejecimiento de la planta, pero no la composición química ni el rendimiento del grano (Chávez-Herrera et al., 2018).

Los LPS de *A. brasilense* Sp245 también estimulan el crecimiento temprano de las plantas de trigo, así como respuestas bioquímicas relacionadas con el crecimiento. En condiciones *in vitro*, plántulas de cuatro días después del tratamiento con diversas concentraciones de LPS (10 a 1000 µg/mL), mejoraron su crecimiento teniendo un aumento significativo en la longitud de las hojas y las raíces, así como en el peso fresco. La actividad de la enzima peroxidasa (POD) aumentó significativamente en las raíces tratadas con LPS y fue dependiente de la concentración. Este incremento fue disminuido ante la presencia del lantano, un inhibidor de los canales de calcio, lo que sugirió que los niveles de Ca²⁺ están involucrados en la actividad biológica mediada por LPS (Hernández-Esquivel et al., 2020).

En plantas de pepino (*Cucumis sativus*) cultivadas en invernadero, la aspersión semanal de LPS de *A. brasilense* Sp245 (a concentraciones de 10 y 100 µg/ml) durante dos meses, iniciada cinco días después de la germinación, tuvo diversos efectos. Ambas concentraciones incrementaron la longitud total de las plantas en comparación con los controles no tratados, pero solo la concentración de 10 µg/ml aumentó significativamente el peso fresco total. El contenido de fenoles totales en las hojas se incrementó notablemente con ambas concentraciones de LPS. La actividad *in situ* de la POD fue estimulada únicamente por la concentración de 100 µg/ml. Estos resultados sugieren que los LPS pueden estimular respuestas

asociadas tanto con el crecimiento como con la defensa en plantas de pepino (Morales-Ascencio et al., 2019).

En *Arabidopsis thaliana*, el tratamiento con LPS (100 y 150 µg/mL) de *A. brasilense* Sp245 incrementó el peso fresco total de la planta, la longitud de la raíz y los niveles de transcrito de *TOR* en el meristemo radicular. Además, se observó un aumento en la fosforilación de la proteína S6k, un blanco de *TOR*. El tratamiento prolongado con LPS también aumentó el tamaño de la roseta y el número de tallos y silicuas por planta, lo que sugiere que los LPS de *Azospirillum brasilense* Sp245 afectan el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* mediante un mecanismo que involucra a la proteína *TOR* (Méndez-Gómez et al., 2020).

También ha sido evaluado el efecto de los LPS de *Azospirillum brasilense* Sp245 en la actividad morfogénica en tejidos somáticos de trigo, utilizando dos líneas con diferentes capacidades embriogénicas; una de estas líneas porta el gen de enanismo Rht-B1, mientras que la otra carece de él. Al añadirse al medio nutritivo, LPS de *A. brasilense* Sp245 se promovió la formación de callos con centros meristemáticos y se estimuló la capacidad de regeneración de los tejidos cultivados en ambas líneas (Evseeva et al., 2018). El antígeno O del LPS de *Azospirillum* parece crucial para esta actividad morfogénica. En un estudio comparativo de LPS de tres cepas de *Azospirillum* en callos de trigo reveló que el LPS de *A. lipoferum* SR65 promovió la morfogénesis del callo en ambas líneas de trigo. Mientras tanto, el LPS de *A. brasilense* SR55 y SR75 mejoraron selectivamente el rendimiento de callos morfogénicos o el rendimiento de plantas regeneradas, respectivamente. En general, los LPS de *Azospirillum* tuvieron mayor efecto en la línea LRht-B1a, de baja capacidad morfogénica, que en la línea LRht-B1c, de alta capacidad morfogénica (Tkachenko et al., 2021).

3.4. Las fosfolipasas en plantas

Las fosfolipasas (PL) representan una familia ubicua de proteínas que escinden diversos enlaces en los fosfolípidos para mantener la homeostasis y la estabilidad de los lípidos de la membrana. Se clasifican en cuatro tipos principales: fosfolipasa D (PLD), fosfolipasa C (PLC), fosfolipasa A1 (PLA 1) y fosfolipasa A2 (PLA 2). La

PLC y la PLD escinden el primer y el segundo enlace fosfodiéster, respectivamente, mientras que las PLAs liberan a los ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana (Wang et al., 2012). Dentro de cada tipo, se distinguen diferentes familias o subfamilias de enzimas que pueden variar en su especificidad de sustrato, requerimiento de cofactores y/o condiciones de reacción (Wang et al., 2012).

Estas enzimas catalizan la remodelación lipídica, necesaria para generar respuestas rápidas de las plantas a las señales ambientales. Producen segundos mensajeros, como el ácido fosfatídico (AF), y, por lo tanto, desencadenan o modulan cascadas de señalización que provocan cambios en la expresión génica. También participan en las respuestas de las plantas al estrés abiótico y en diversos procesos de su desarrollo (Takác et al., 2019b). Así como en la actividad de algunas fosfolipasas participa en la biosíntesis de lípidos de almacenamiento (Wang et al., 2012). Además, la PLD y su producto AF median la señalización de varias hormonas vegetales, entre ellas el ácido abscísico, las giberelinas, el etileno, las citoquininas, el ácido jasmónico, y las auxinas (Li et al., 2007). Dada la extensa investigación sobre su papel en estas respuestas, se abordará únicamente la PLD, enzima de interés en esta investigación.

3.4.1. La fosfolipasa D en plantas

Las fosfolipasas D (PLD) en plantas comprenden un grupo heterogéneo de enzimas que catalizan la hidrólisis de fosfolípidos estructurales presentes en las membranas, tales como la fosfatidilcolina (PC), la fosfatidiletanolamina (PE) y el fosfatidilglicerol (PG), generando AF y varios grupos principales, tales como la colina y la etanolamina (Pacheco y Quinto, 2022). Su actividad en plantas se describió por primera vez en la década de 1940 (Hanahan y Chaikoff, 1947). Sin embargo, su estudio cobró relevancia en la década de 1990 al descubrirse su papel en la señalización celular. La primera clonación de una PLD se realizó a partir de la semilla de ricino (Wang et al., 1994), lo que facilitó la comprensión de sus funciones a nivel molecular. Actualmente, se conoce la existencia de múltiples tipos de PLD en plantas superiores (Wang et al., 2014), las cuales se localizan en diversos compartimentos subcelulares, como la pared celular, la membrana plasmática, el

citoplasma, el cloroplasto, la vacuola y el núcleo (McGee et al., 2003; Novak et al., 2018).

Los miembros de la familia PLD participan en una amplia gama de procesos celulares y fisiológicos cruciales para la vida de la planta. Estos incluyen la regulación estomática, la señalización de respuestas a estrés abiótico (sequía, salinidad, etc.) y biótico, la organización del citoesqueleto (microtúbulos y actina), el crecimiento del tubo polínico, el reciclaje de fósforo y la señalización de la disponibilidad de nitrógeno, (Li y Wang, 2019; Takác et al., 2019b).

Las PLD vegetales se puede clasificar en dos grupos según sus requerimientos de Ca^{2+} : Las PLD dependientes de Ca^{2+} contienen un dominio C2 de unión a fosfolípidos dependiente de Ca^{2+} en el extremo amino terminal y las PLD independientes de Ca^{2+} tienen dominios PX (homología con phox), PH (homología con pleckstrina) y SP (péptido señal). Los dominios PX y PH son dos pliegues estructurales distintos que interactúan con fosfoinosítidos y dirigen la localización de proteínas a la membrana en la señalización mediada por polifosfoinosítidos (Li y Wang, 2019). El dominio PX se une a fosfoinosítidos específicos como el fosfatidilinositol 3-fosfato y el fosfatidilinositol (3,4)-bisfosfato (Seet y Hong, 2006), mientras que el dominio PH reconoce varios fosfoinosítidos, incluyendo el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato y el fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (Maffucci y Falasca, 2001). Las SP-PLD contienen un péptido señal en su extremo amino en lugar del dominio C2 o PX/PH; solo se ha identificado una SP-PLD vegetal, que está codificada en el genoma de *O. sativa* (Li et al., 2007; Pacheco y Quinto, 2022) y la remodelación de fosfolípidos de membrana en respuestas a la privación de fosfato y a las bajas temperaturas (Wang et al., 2012).

Las PLD de distintos grupos pueden mostrar selectividad de sustrato variable. Por ejemplo, los miembros individuales del subgrupo C2-PLD pueden hidrolizar PC, PE y fosfatidilglicerol (PG) con afinidades diferentes, mientras que las PX/PH-PLD utilizan exclusivamente PC como sustrato. Esta selectividad implica que diferentes PLD pueden generar una diversidad de AF con composiciones de acilo distintas al hidrolizar diferentes fosfolípidos (Deepika y Singh, 2021).

3.4.2. La fosfolipasa D en *Arabidopsis thaliana*

En *Arabidopsis thaliana* se han encontrado un total de 12 genes que codifican para los diferentes tipos de PLD (Qin y Wang, 2002). Estos miembros codifican seis isoformas: α (1,2,3), β (1,2), γ (1,2,3), δ , ζ (1,2) y ϵ basados en su secuencia y propiedades bioquímicas. Además, estas isoformas se clasifican según los dominios de unión a fosfolípidos en sus extremos amino: C2-PLD y PX/PH-PLD (Pacheco y Quinto, 2022). Las PLD α , β , γ , δ y ϵ presentan un dominio C2 cerca del extremo amino terminal mientras que las PLD ζ tiene dominios PH y PX (Qin y Wang, 2002). En ambas subfamilias se requieren dos motivos HKD para la catálisis, un residuo de histidina actuando como nucleófilo y el otro como ácido/base (Stuckey y Dixon 1999; Wang et al., 2014).

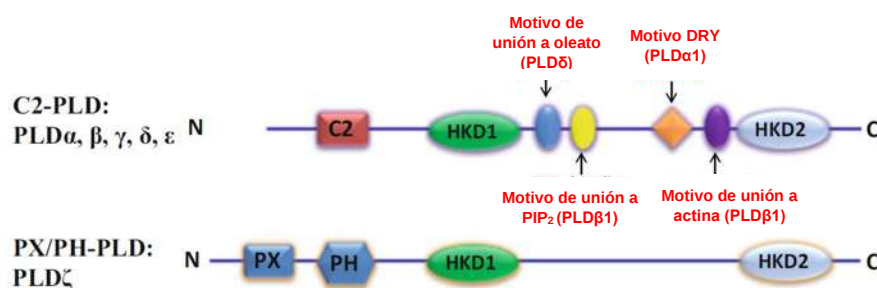


Figura 2. Estructura de los dominios de las dos subfamilias de PLD en *Arabidopsis*.

C2, dominio de unión a fosfolípidos dependiente de Ca^{2+} ; PH, dominio de homología de pleckstrina; PX, dominio de homología de phox; HKD, motivo HxKxxxxD (HKD) involucrado en la catálisis; motivo DRY, que interactúa con $\text{G}\alpha$. Modificado de Wang et al. (2014).

3.4.3. Funciones de las PLD en *Arabidopsis thaliana*

Los patrones de expresión de las PLD están controlados por el desarrollo y son dependientes del tejido (Takác et al., 2019b). Sus características bioquímicas y moleculares diversas sugieren una activación selectiva en función de las condiciones de crecimiento y desarrollo, lo que les confiere funciones especializadas (Li et al., 2009), a continuación, se mencionarán algunas de ellas.

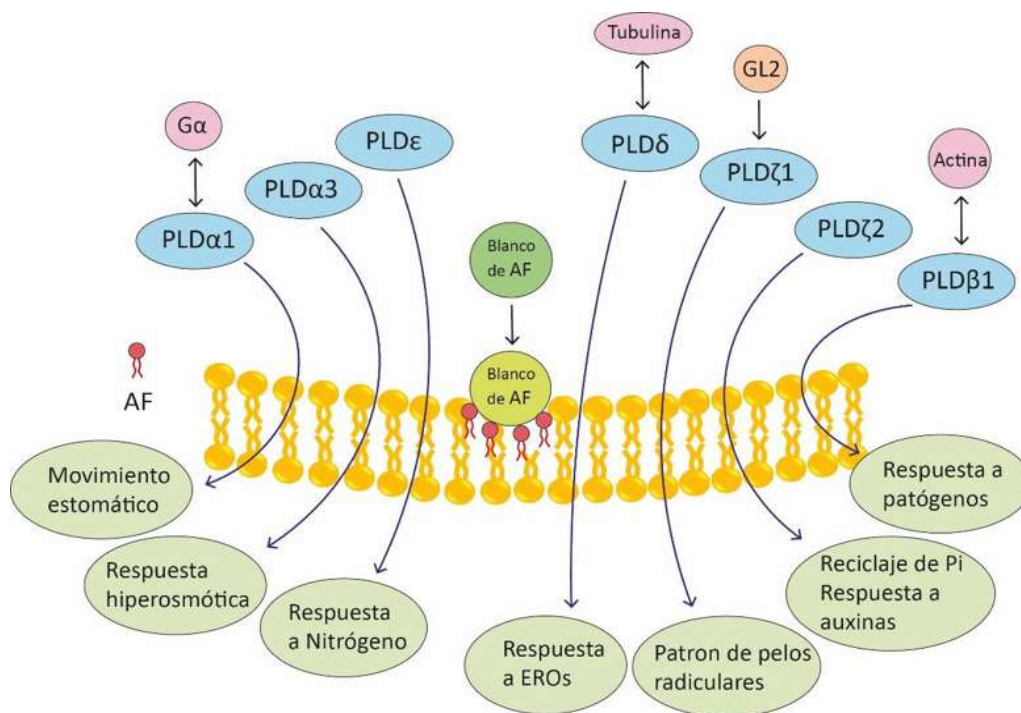


Figura 3. Funciones de las PLD.

Las diferentes PLD se activan por diferentes estímulos, mostrando distintas preferencias de sustrato y asociándose con diferentes membranas. Sus patrones de expresión varían tanto temporal como espacialmente. La activación diferencial se manifiesta en los distintos requerimientos de reacción y en su interacción con proteínas como Gα, actina y los citoesqueletos de microtúbulos. En varios casos, esta diferenciación se ha documentado mediante el uso de plantas mutantes deficientes en PLD específicas bajo condiciones fisiológicas particulares. La activación de diferentes PLD regula la ubicación, el momento y la especie molecular de AF, que interactúa con dianas específicas en diversos procesos celulares. Cabe destacar que GL2 se une a la región promotora de PLDζ1, en lugar de una interacción directa proteína-proteína. Modificado de Li et al. (2009).

3.4.3.1. Respuesta al estrés abiótico

El estrés abiótico, como la sequía, la salinidad, las heladas y el calor, estimulan las PLD de las plantas. Las PLDα1 y PLDδ contribuyen a la reducción de la pérdida de agua a través de su función en la señalización del ácido abscísico (ABA), el cual induce el cierre estomático. El análisis de la epidermis foliar de *Arabidopsis* reveló que la supresión o inactivación de PLDα1 comprometía el cierre estomático promovido por ABA. Se observó el mismo efecto en plantas deficientes en PLDδ (Zhang et al., 2004; Distéfano et al., 2012; Guo et al., 2012; Wang et al., 2014). El AF derivado de PLDα1 inhibe la enzima insensible a ABA 1 (ABI1) y activa la enzima

NADPH oxidasa, lo que promueve la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Zhang et al., 2004). El H_2O_2 oxida y, por lo tanto, inactiva las gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasas reducidas (GAPCred) en el citosol. La GAPC oxidada (GAPCox), a su vez, interactúa con PLD δ y la activa. El AF producido por la PLD δ activada probablemente regula componentes de la vía de señalización de ABA para el cierre estomático (Guo et al., 2012; Deepika y Sihgh, 2021).

Durante el estrés salino, la PLD α 1 y el AF, interactúan y regulan las proteínas cinasas activadas por mitógenos 3 (MAPK3) y 6 (MAPK6). La MAPK6, activada por el AF interactúa y fosforila el antiportador de Na^+/H^+ SOS1, facilitando la eliminación del exceso de Na^+ de la célula y previene así la toxicidad por sodio. Adicionalmente, el AF derivado de PLD α 1 se une a la proteína asociada a microtúbulos MAP65-1, mediando la estabilización de estos, lo que contribuye a una mayor tolerancia a la sal (Yu et al., 2010; Vadovič et al., 2019; Deepika y Shigh, 2021).

La PLD α 3 regula positivamente las respuestas de las plantas al estrés hiperosmótico. La sobreexpresión de PLD α 3 promueve el crecimiento de las raíces, la floración y la prevención del estrés causado por el déficit hídrico y la salinidad, mientras que la inactivación de PLD α 3 presenta mayor sensibilidad, las plantas florecen más tarde que las silvestres en condiciones ligeramente secas y tienden a inducir genes sensibles al ácido abscísico con mayor facilidad que las plantas silvestres. Además, bajo ambas condiciones de estrés hiperosmótico, los niveles de transcrito de *TOR* y el estado de fosforilación de la proteína S6K fueron inferiores en las plantas PLD α 3-KO y superiores en las plantas OE en comparación con las plantas silvestres (Hong et al., 2008).

Respecto a la respuesta a bajas temperaturas, la supresión genética de PLD δ sensibilizó a las plantas de *A. thaliana* a la congelación, en contraste con la sobreexpresión de PLD δ , que incrementó su tolerancia. Durante la congelación en plantas silvestres, la PLD δ participa en la producción de aproximadamente el 20% del ácido fosfatídico, y su sobreexpresión aumenta la producción de especies de ácido fosfatídico. Sin embargo, las modificaciones en PLD δ no influyeron en la expresión de los genes *COR47* (cold-regulated47) y *COR78* (cold-regulated78)

inducidos por el frío, ni alteraron la acumulación de prolina o azúcares solubles en respuesta a bajas temperaturas, lo que indica que la vía PLD constituye un factor determinante específico en la respuesta a la congelación (Li et al., 2004). Además, el aumento de la actividad lipolítica durante la congelación altera la composición lipídica de la membrana. Mutantes en $PLD\alpha$ revelaron que la $PLD\alpha$ causa la hidrólisis de PC tras la congelación de plantas silvestres, la PC se hidroliza en mayor medida que el PE o el PG. Estos datos sugieren que la PC es el principal sustrato *in vivo* de la $PLD\alpha$ (Welti et al., 2002).

3.4.3.2. Respuesta a nutrientes

La inactivación de $PLD\epsilon$ (KO) resulta en una disminución del crecimiento radicular y la acumulación de biomasa, mientras que su sobreexpresión (OE) tiene el efecto contrario. Los niveles de AF se correlacionan positivamente con la sobreexpresión de $PLD\epsilon$ mientras que en la KO fue menor que en plantas silvestres. En respuesta a la disponibilidad de nitrógeno (N), la OE y la KO de $PLD\epsilon$ mostraron efectos opuestos en la elongación de las raíces laterales. Sin embargo, la sobreexpresión de $PLD\epsilon$ también promovió el crecimiento de los pelos radiculares y la raíz primaria bajo condiciones de severa deficiencia de N. Esto concluye que la $PLD\epsilon$ y su producto AF desempeñan un papel importante en la promoción del crecimiento general de la planta y en la respuesta a la disponibilidad de nitrógeno (Hong et al., 2009).

Las $PLD\zeta1$ y $\zeta2$ participan en la conservación y el reciclaje del fósforo en condiciones de crecimiento con fósforo limitado, iniciando la vía de remodelación que convierte los fosfolípidos en galactolípidos (Li et al., 2006; Cruz-Ramírez et al., 2006; Wang et al., 2012). La mutante de $PLD\zeta2$ exhibe deficiencias en la hidrólisis de fosfolípidos y una capacidad reducida para la acumulación de galactolípidos bajo condiciones limitantes de fosfato (Pi). Adicionalmente, su sistema radicular mostró una alteración en la arquitectura en respuesta a la deficiencia de Pi. Esto sugiere que $PLD\zeta2$ participa en la ruta de biosíntesis de galactolípidos, específicamente en la hidrólisis de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina para generar diacilglicerol, precursor de la síntesis de digalactosildiacilglicerol, y Pi libre, esencial para otros procesos metabólicos (Cruz-Ramírez et al., 2006). La señalización lipídica podría

ser un mecanismo clave en la traducción de la detección del estado nutricional por la membrana para aumentar el crecimiento vegetal y la producción de biomasa (Hong et al., 2009).

3.4.3.3. Funciones celulares y de desarrollo

Varias de las funciones del desarrollo de las PLD dependen del estrés y de los estímulos hormonales porque las PLD se activan en respuesta a factores de estrés y hormonas, que van acompañados de acumulación de AF (Takáč et al., 2019b).

La deficiencia de PLD ζ 2 en *Arabidopsis* disminuye la sensibilidad a la auxina, el gravitropismo radicular y la elongación del hipocótilo. En contraste, la sobreexpresión genera efectos opuestos, lo que sugiere que PLD ζ 2 media positivamente las respuestas a la auxina, a través del AF. Además de PLD ζ 2 también participa en la regulación del tráfico vesicular. PLD ζ 2 y AF son necesarios para un ciclo normal de vesículas que contienen PIN2 en el transporte polar de auxinas (Li et al., 2007). Adicionalmente, Yuan et al. (2018) utilizando mutantes simples y dobles, demostraron que PLD ζ 2 promueve el crecimiento de la raíz primaria e inhibe la densidad y longitud de los pelos radiculares. El desarrollo de los pelos radiculares en *Arabidopsis* está controlado por una red de genes, siendo GLABRA2 (GL2) un factor de transcripción clave en las etapas finales. Se ha encontrado que PLD ζ 1 es un blanco directo de GL2 que regula el desarrollo de los pelos radiculares a través de la modulación de la señalización de fosfolípidos (Ohashi et al., 2003).

Durante la germinación de las semillas, la inactivación de PLD α 1 o PLD δ resulta en semillas con menor sensibilidad a la inhibición de ABA, y el efecto fue mayor en mutantes dobles de PLD α 1 y PLD δ (Uraji et al., 2012). Estos resultados sugieren que PLD α 1 y PLD δ intervienen en la mediación del efecto de ABA no solo en el cierre estomático, sino también en la germinación de las semillas (Wang et al., 2014).

Experimentos con 1-butanol indican que la producción de AF dependiente de PLD es crucial para la germinación y la morfogénesis en *Arabidopsis*, posiblemente al mantener la correcta alineación transversal de los microtúbulos en las células

radiculares en elongación ya que, a nivel celular, el 1-butanol (0.2 y 0.4%) altera la organización de los microtúbulos corticales. En contraste, otros isómeros de butanol (2- y 3-butanol) que no inhiben la producción de AF no mostraron efectos en la germinación, el crecimiento o la organización de los microtúbulos. (Gardiner et al., 2003).

La PLD y el AF desempeñan un papel en el proceso de expansión celular polarizada de las plantas, representado por el crecimiento del tubo polínico. La germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico se inhiben con la presencia de 1-butanol al 0.5%, mientras que los isómeros secundarios y terciarios no tienen efecto. Esta inhibición puede revertirse al añadir liposomas exógenos de AF (Potoký et al., 2003).

La PLD α 1 también participa en la biogénesis de los cloroplastos. PLD α 1-KO presentó alteraciones en los niveles de TIC40, un regulador clave en la importación de proteínas a los cloroplastos. Además, de una acumulación diferencial de complejos proteicos fotosintéticos y cambios en el tamaño de los cloroplastos. La mutación en PLD α 1 también afectó proteínas relacionadas con la pared celular, la homeostasis redox y la señalización del ácido abscísico (Takáč et al., 2019a).

3.4.3.4. Participación en la interacción planta-bacteria

La deficiencia de PLD β 1 en plantas de *Arabidopsis* confiere una mayor resistencia a la infección por *Pseudomonas syringae* pv. DC3000 (Pst DC3000) en relación con las plantas silvestres. Esta resistencia fue más marcada frente a la cepa virulenta de Pst DC3000 que ante la cepa avirulenta avrRpt2. Además, se observa una producción incrementada de ácido salicílico (SA) y una respuesta inmunitaria vinculada a SA en plantas de *Arabidopsis* con PLD β 1-KO indicando que PLD β 1 funciona como un regulador negativo de la inmunidad basada en SA, promoviendo así la susceptibilidad a patógenos bacterianos biotróficos (Zhao et al., 2013; Li y Wang, 2018).

En la interacción simbiótica, no se han reportado estudios de la participación de PLD en *Arabidopsis*, pero en células en suspensión de un cultivo de alfalfa (*Medicago sativa*) se demostró que la PLD aumenta en respuesta a los factores Nod secretados por *Rhizobium* sp. (Den Hartog et al., 2003).

3.4.4. Regulación de la PLD

La actividad de la PLD en plantas se incrementa en diversas condiciones, sin embargo, la sobreexpresión de PLD no produce un aumento en la hidrólisis de lípidos de membrana bajo condiciones normales de crecimiento (Hong et al., 2008), lo que sugiere una estricta regulación de su actividad celular (Wang et al., 2014).

Su actividad está regulada principalmente por la unión del Ca^{2+} . Se ha propuesto que el Ca^{2+} promueve la unión del sustrato fosfolipídico al sitio catalítico, regulando así la actividad de PLD (Deepika y Singh, 2021). Estudios *in vitro* han demostrado que la $\text{PLD}\alpha$ es activa a altas concentraciones milimolares de Ca^{2+} , en contraste las $\text{PLD}\beta$, γ , δ que son más activas en un rango micromolar de Ca^{2+} , la $\text{PLD}\epsilon$ es activa bajo ambas concentraciones (Li y Wang, 2019). Mientras que las $\text{PLD}\zeta$ se estimulan mediante la unión directa de fosfoinosítidos, en particular el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (Maffucci y Falasca, 2001). La $\text{PLD}\delta$ es activada de manera dosis-dependiente por el ácido oleico libre, alcanzando su máxima eficacia a 0,5 mM. Otros ácidos grasos insaturados, como el linoleico y linolénico, mostraron menor efectividad, mientras que los saturados (esteárico y palmítico) no indujeron activación (Wang y Wang, 2001).

Las PLD también pueden ser reguladas por las especies reactivas de oxígeno (ERO). Yamaguchi et al. (2004) observaron que el tratamiento con H_2O_2 (10–100 μM) estimuló la formación de AF dependiente de PLD en células en suspensión de un cultivo de arroz. En *Arabidopsis thaliana* la $\text{PLD}\delta$ se activa en respuesta al H_2O_2 . Plantas mutantes *pldδ* son más susceptibles a la muerte celular inducida por H_2O_2 , mientras que el ácido fosfatídico generado por la actividad de $\text{PLD}\delta$ juega un papel en la reducción de este proceso (Zhang et al., 2003).

Además, se ha documentado que las PLD interactúan con proteínas. Por ejemplo, la $\text{PLD}\alpha 1$ interactúa con la subunidad α heterotrimérica de la proteína G regulando su actividad (Zhao y Wang, 2004). La $\text{PLD}\beta 1$ contiene una región específica de unión a la actina. Mientras que la G-actina inhibe la actividad de $\text{PLD}\beta$, la F-actina la estimula (Kusner et al., 2002; Wang et al., 2014). En la interacción $\text{PLD}\alpha 1$ - $\text{G}\alpha$, $\text{PLD}\alpha 1$ se une a $\text{G}\alpha$, unida a GDP, y esta interacción disminuye su actividad. En

respuesta al ABA, la activación de $G\alpha$ puede interrumpir la unión de $G\alpha$ -GDP a $PLD\alpha1$ y, por lo tanto, activar $PLD\alpha1$ (Wang et al., 2014).

Adicionalmente, la expresión de $PLD\zeta2$ es potenciada por las auxinas. Las raíces de las plántulas mutantes en $PLD\zeta2$ fueron menos sensibles a esta hormona que las de las plántulas silvestres (Li y Xue, 2007; Pacheco y Quinto et al., 2022). La heterogeneidad de las actividades, regulaciones e interacciones moleculares de las PLD indica que cada una de ellas puede activarse y regularse de forma diferente. Además, sus diferencias en la expresión espacial y temporal en plantas afectan la ubicación de la hidrólisis lipídica y la producción de AF (Li y Wang, 2019).

3.4.5. Inhibidores de la señalización de la PLD

La PLD cataliza la hidrólisis del enlace éster que une el grupo fosfatidilo al glicerol y la transferencia del grupo fosfatidilo a un aceptor nucleofílico, siendo el agua el aceptor habitual, lo que resulta en la formación de AF (Munnik et al., 1995). Sin embargo, la PLD tiene la capacidad única de transferir el grupo fosfatidilo a un alcohol primario, formando un alcohol fosfatídico en lugar de AF (Wang, 2005). Este proceso conocido como transfosfatidilación desvía la producción AF derivado de fosfolípidos hacia la formación de fosfatidilalcohol. Esto se debe a que los alcoholes primarios, lejos de inhibir a las PLD, generalmente activan su función, dirigiendo la reacción hacia la formación de fosfatidilalcohol y reduciendo así la disponibilidad de precursores para la síntesis de AF (Li y Wang, 2019). Los alcoholes secundarios y terciarios no pueden inhibir la formación de AF, puesto que no son sustratos para la transfosfatidilación (Munnik et al., 1995).

El n-butanol o 1-butanol es un alcohol primario considerado como un inhibidor competitivo en la formación de AF mediado por la PLD (Munnik et al., 1995) y se ha utilizado ampliamente como sustrato para examinar las funciones de la PLD en diversos procesos biológicos (Pacheco y Quinto, 2022).

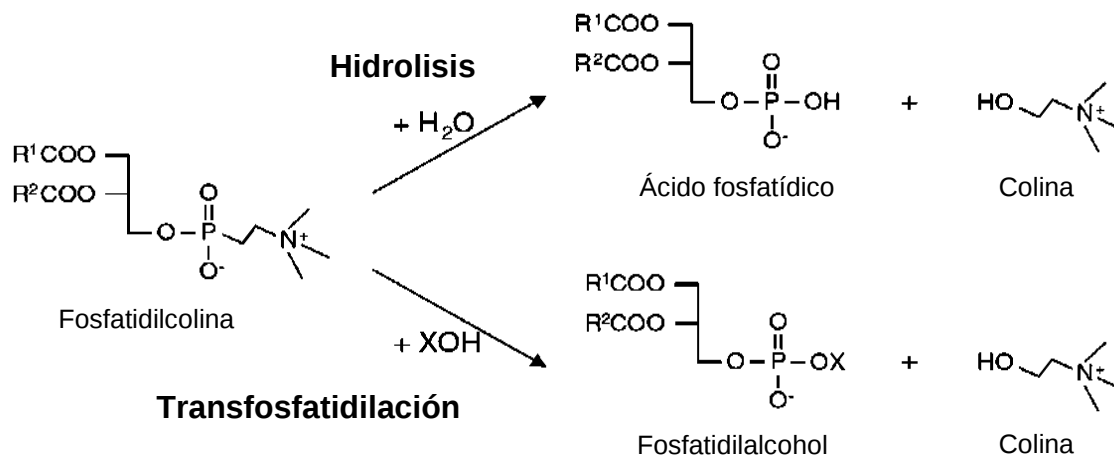


Figura 4. Reacción de hidrólisis y transfosfatidilación por la fosfolipasa D.

La hidrólisis catalizada por la PLD ocurre en dos etapas. Primero, la enzima forma un intermediario fosfatidilo-enzima. Posteriormente, en presencia de agua (H₂O), el grupo fosfatidilo se transfiere a la fracción OH, generando ácido fosfatídico (AF) y liberando el grupo funcional o “cabeza” del fosfolípido. Una característica distintiva de la PLD es su capacidad para transferir el grupo fosfatidilo a un alcohol primario, produciendo un fosfatidil alcohol en lugar de ácido fosfatídico. Modificado de Nakazawa et al. (2011).

3.4.6. Síntesis de fosfatidilcolina

La colina es una amina cuaternaria que se destina principalmente a la síntesis de fosfatidilcolina (PC). Esta síntesis ocurre a través de la vía de Kennedy, la cual implica la activación de la colina para formar citidina difosfocolina (CDP-colina). Luego, la CDP-colina reacciona con diacilglicerol (DAG) para producir PC (Gibellini y Smith, 2010).

La síntesis de PC en plantas ocurre a través de la vía CDP-colina, una ruta metabólica conservada también en levaduras y otros organismos eucariotas (Datko y Mudd, 1988; Bolognese y McGraw, 2000). Esta vía biosintética requiere la fosfocolina (PCho) como precursor fundamental para la formación de PC. Particularmente en plantas, la PC se sintetiza mediante una serie de tres reacciones secuenciales de N-metilación de la fosfoetanolamina (PEA). Estas metilaciones son catalizadas por una única enzima, la S-adenosil-L-metionina:fosfoetanolamina N-

metiltransferasa (PEAMT) (Datko y Mudd, 1988; Munnik et al., 1998; Cruz-Ramírez et al., 2004).

En *Arabidopsis thaliana* la mutante *xipotl* (*xpl1*), posee una mutación en el gen *PEAMT* (*XIPOTL1*), presenta un fenotipo caracterizado por una raíz primaria corta, un mayor número de raíces laterales y células epidérmicas cortas con morfología aberrante. La inhibición de la biosíntesis de PC en esta mutante no solo altera el desarrollo radicular, sino que también induce la muerte celular en las células epidérmicas de la raíz. Este proceso de muerte celular puede revertirse mediante el tratamiento con ácido fosfatídico, lo que sugiere que moléculas posteriores en la ruta de biosíntesis de PC son cruciales para el desarrollo radicular y actúan como señales para la integridad celular (Cruz-Ramírez et al., 2004).

3.4.7. Vías de producción de ácido fosfatídico

El ácido fosfatídico (AF) es un glicerolípido de membrana compuesto de glicerol-3-fosfato y dos cadenas de ácidos grasos (Kolesnikov et al., 2022). Que puede ser generado por tres mecanismos principales: primero, por la vía de síntesis de *novo* que ocurre en el retículo endoplasmático y los plastidios a través de dos vías de acilación diferentes, denominadas según su precursor: la vía del glicerol 3-fosfato (G3P) y la vía de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP). En la vía del G3P, este es acilado primero por la G3P aciltransferasa para formar 1-acil-G3P (también conocido como ácido lisofosfatídico; LPA). En la vía de la DHAP, tras la síntesis de 1-acil-DHAP a partir de DHAP por la DHAP aciltransferasa, este producto se convierte en LPA mediante una reacción de reducción dependiente de fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido (NADPH). Una vez que se forma LPA a través de cualquiera de las dos vías, finalmente es acilado a AF por la aciltransferasa del ácido lisofosfatídico (LPAAT) (Foster, 2013; Kolesnikov et al., 2022; Zou et al., 2024).

La segunda vía para la generación de AF implica la hidrólisis por parte de la fosfolipasa C (PLC) del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato en dos segundos mensajeros: inositol 1,4,5-trifosfato y diacilglicerol (DAG). El DAG es fosforilado instantáneamente a AF por la actividad de la diacilglicerol cinasa (DGK) (Munnik, 2001).

La tercera vía consiste en la hidrólisis de los fosfolípidos por la PLD descrita anteriormente. Las distintas clases de fosfolípidos (PC, PG, PS) presentan variaciones en sus grupos acilo en las posiciones sn-1 y sn-2. Estas diferencias influyen en la especificidad de sustrato de las diversas PLD, lo que resulta en la producción de distintas especies moleculares de AF (Li y Wang, 2018). El AF derivado de la vía DGK se puede distinguir del AF derivado de PLD, en función de su composición de ácidos grasos y sus características diferenciales de marcaje con ^{32}Pi (Arisz et al., 2009; Testerink y Munnik, 2011).

La síntesis de AF es fundamental en la síntesis de fosfolípidos y triglicéridos de membrana y, por lo tanto, representa un indicador potencial de la capacidad de generar los fosfolípidos de membrana necesarios para aumentar la masa celular durante la división (Foster, 2013).

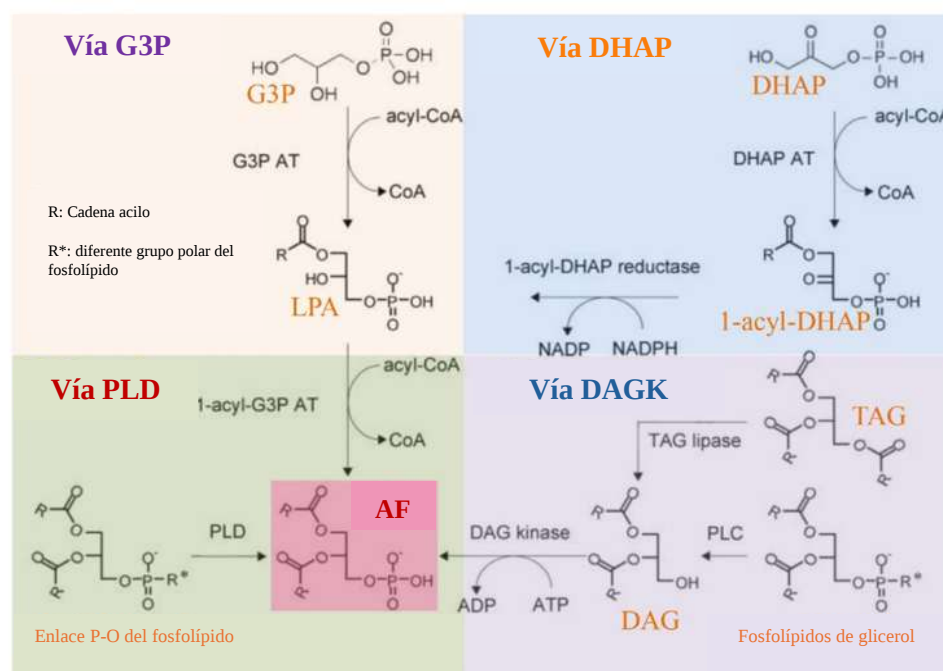


Figura 5. Vías de biosíntesis del ácido fosfatídico (AF).

El AF puede sintetizarse de novo mediante dos vías de acilación diferentes: la vía del glicerol 3-fosfato (G3P) y la vía de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP). El AP también puede generarse mediante la vía de la fosfolipasa D (PLD) y la vía de la diacilglicerol quinasa (DAGK). La hidrólisis del enlace P-O del fosfolípido mediada por PLD produce AP. La DAGK fosforila el diacilglicerol (DAG) para formar PA. El DAG se obtiene por desacilación del triacilglicerol por la lipasa de triacilglicerol (TAG), o por hidrólisis de fosfolípidos de glicerol por la acción de la fosfolipasa C (PLC). Modificado de Zhou et al. (2024).

3.4.8. El ácido fosfatídico como segundo mensajero

El AF es un importante segundo mensajero lipídico en las células fundamental en la regulación del metabolismo y la transducción de señales en plantas y otros organismos (Munnik et al., 2001). Al igual que los niveles de la mayoría de los fosfolípidos, su concentración es altamente dinámica y experimenta cambios específicos, rápidos (en segundos o minutos) y transitorios (volviendo finalmente al nivel basal) en respuesta a diversos estímulos extracelulares, hormonales o de estrés. La concentración de AF difiere significativamente según el tipo de tejido vegetal, la fase de desarrollo de la planta, la condición del tratamiento y la técnica de registro (Kolesnikov et al., 2022). En hojas de *Arabidopsis thaliana*, el nivel de AF se ha determinado entre 0.5 y 1.5 nmol/mg de peso seco, correspondiendo a una concentración de 50 a 150 μM (Welti et al., 2002; Zhang et al., 2004). La formación de AF se ha vinculado a diversos tratamientos y respuestas de las plantas. Curiosamente, la mayoría de estos implican estrés biótico o abiótico, lo que sugiere que el AF desempeña un papel como molécula general de señalización del estrés (Munnik et al., 2001). Actúa como segundo mensajero en las vías de señalización de diversas hormonas (auxina, brasinoesteroides, ácido salicílico, ácido abscísico, ácido jasmónico y giberelinas) y otros compuestos bioactivos, siendo crucial para el crecimiento, desarrollo y resistencia a estrés ambiental (Kolesnikov et al., 2022).

El ácido fosfatídico influye en las funciones celulares mediante diversos mecanismos, que incluyen la unión directa a proteínas y la alteración biofísica de las membranas. La unión del AF a proteínas modula su actividad o las ancla a la membrana. Biofísicamente, el AF altera la curvatura e integridad de las membranas e influye en las interacciones proteína-membrana. El AF es un intermediario clave en el metabolismo de glicerolípidos y participa en la generación de mensajeros lipídicos como lisofosfolípidos (lisoPA), diacilgliceroles (DAG), ácidos grasos libres y oxilipinas. (Li et al., 2009).

En *Arabidopsis thaliana* se han identificado varias proteínas de unión a AF entre ellas están la RbohD, RbohF (Respiratory burst oxidase homolog protein D y F), RGS1(regulator of G-protein signaling), MPK6 (mitogen-activated protein kinase 6),

MKK7 (mitogen-activated protein kinase kinases), SnRK2.4(sucrose non-fermenting-1-related protein kinase). Se cree que muchas de ellas desempeñan un papel en la transducción de señales en plantas. Sin embargo, solo se dispone de una caracterización detallada de su función biológica, así como del descifrado de la interacción con AF a nivel molecular, para algunas de ellas dado que aún no se ha identificado ningún motivo de reconocimiento de AF en proteínas vegetales (ni en proteínas animales), se ha propuesto que los complejos pliegues estructurales de una proteína intervienen en el reconocimiento de AF. Los módulos de unión de AF suelen consistir en una hélice anfipática con aminoácidos con carga positiva en un lado (p. ej., un motivo de secuencia rico en lisina) y residuos hidrofóbicos en el otro (Kolesnikov et al., 2022).

3.5. La Proteína Blanco de la Rapamicina (TOR)

En 1975, Sehgal y colaboradores purificaron un metabolito macrólido, producido por *Streptomyces hygroscopicus*, una bacteria aislada de una muestra de suelo en la Isla de Pascua (llamada Rapa Nui en la lengua local). Este compuesto recibió entonces el nombre de “Rapamicina” en referencia a su lugar de origen (Sehgal et al., 1975; Liu y Xiong, 2022). La rapamicina es un antibiótico y antimicótico, en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, detiene la división celular y el crecimiento. La búsqueda de mutaciones que causan resistencia a la rapamicina en levaduras identificó la proteína de unión a FK506 12 (FKBP12) junto con una proteína cinasa grande, que se denominó blanco de la rapamicina (TOR; Target Of Rapamycin) (Heitman et al., 1991; Dobrenel et al., 2016). TOR es una proteína cinasa serina-treonina atípica con un tamaño de 280 KDa, pertenece a la familia de las proteínas cinasas relacionadas a la fosfatidilinositol 3-cinasa (PIKK; Phosphatidylinositol 3-Kinase-related protein Kinase) (Zhao y Wang, 2020). A pesar de los distintos programas de desarrollo y estrategias de supervivencia de los eucariotas todos poseen una cinasa TOR funcional, que integra señales ambientales y nutricionales para dirigir el crecimiento y desarrollo (Shi et al., 2018; McCready et al., 2020). La mayoría de los genomas de eucariotas incluyendo plantas, animales y humanos tienen un solo gen TOR (Zhao y Wang, 2020). Aunque existen excepciones como en caso del algodón mexicano (*Gossypium hirsutum*) que posee cuatro genes TOR

(Song et al., 2019; Fu et al., 2020), y en especies vegetales como *Glycine max*, *Populus trichocarpa* y *Brassica rapa*, donde se han identificado dos genes TOR (Fu et al., 2020) al igual que en levaduras (Heitman et al., 1991; Zhao y Wang, 2020). En *Arabidopsis thaliana* ha sido localizado un solo gen TOR (*AtTOR*) en el cromosoma 1, el cual codifica a la proteína TOR (Menand et al., 2002).

3.5.1. Complejos de la proteína TOR

La proteína TOR forma dos complejos distintos en los organismos: el complejo TOR 1 (TORC1) y el complejo TOR 2 (TORC2) (Figura 6). En mamíferos son formados ambos complejos mientras que en plantas TOR existe solo como TORC1 (Zhao y Wang, 2020). En TORC1, los constituyentes incluyen a la proteína TOR, LST8; (Lethal with Sec 13 protein 8) en plantas y levaduras, mLST8 (mammalian Lethal with Sec 13 protein 8) en mamíferos y RAPTOR (Regulatory Protein Associated with TOR) en mamíferos y plantas/KOG1 (Kontroller of growth 1) en levaduras. TORC2, por otro lado, consta de TOR, LST8/mLST8, RICTOR (Rapamycin Insensitive Companion of TOR) y SIN1 (Stress-activated MAP Kinase Interacting Protein 1) en levaduras (Rabeh et al., 2024).

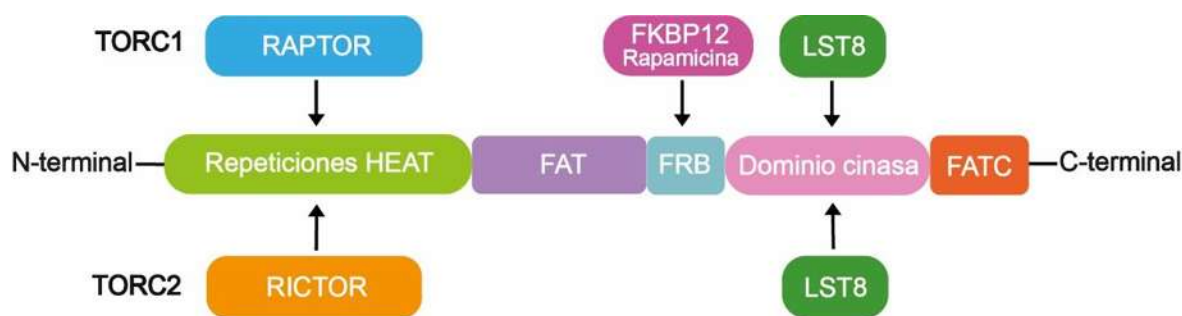


Figura 6. Estructura de los complejos de la proteína TOR.

TORC1 incluye tres componentes principales: TOR, RAPTOR y LST8, mientras que TORC2 incluye a las proteínas: TOR, RICTOR y LST8. La proteína TOR consta de cinco dominios conservados: las repeticiones HEAT N-terminales, el dominio FAT, el dominio FRB, el dominio cinasa y el dominio FATC N-terminal. Figura elaborada, basada en los modelos reportados por Shi et al. (2018) y Rabeh et al. (2024).

La cinasa TOR posee varios motivos y dominios característicos, en la región amino terminal se presenta un tándem de 20 repeticiones HEAT (Huntingtin, Elongation factor 3, subunit of protein phosphatase 2A and TOR1), el dominio FAT (Focal

Adhesion Target), un motivo FRB (FKBP12/Rapamycin-Binding), un dominio cinasa y por último la región FATC (FAT C-terminal), localizado en el extremo carboxilo terminal de la proteína (De Virgilio y Loewith, 2006; Rexin et al., 2015; Dobrenel et al., 2016; Rabeh et al., 2024). La proteína RAPTOR interactúa con el dominio HEAT y regula la actividad de sus sustratos (Zhao y Wang, 2020). LST8 se asocia con el dominio catalítico de mTORC1 y también se requiere para la correcta localización de este complejo. Las repeticiones HEAT facilitan las interacciones proteína-proteína, mientras que los dominios FAT y FATC desempeñan funciones en las interacciones proteicas y la activación de cinasas. El dominio FRB es un blanco para la unión del complejo inhibidor FKBP12-rapamicina (Rabeh et al., 2024). AtTOR comparte una alta similitud en la secuencia de aminoácidos con TOR de humanos, especialmente para su dominio cinasa, sugiriendo que podrían tener propiedades similares y podrían compartir sustratos (Menand et al., 2002).

3.5.2. Componentes río arriba de la ruta TOR en plantas

TOR detecta una amplia variedad de señales, como la luz, glucosa, fitohormonas, nutrientes y se inactiva en condiciones de estrés e inanición (Shi et al., 2018).

La señalización glucosa-TOR proporciona energía esencial, metabolitos, biomasa y mecanismos del ciclo celular mediante la activación transcripcional coordinada en células madre y progenitoras (Xiong et al., 2013). En plantas, se ha descubierto que las raíces acumulan mucha más sacarosa y trehalosa 6-fosfato (Tre6p) que los brotes, lo que puede inhibir la autofagia en gran medida a través de los transportadores de azúcar SWEET (Sugar Water-Extrusion Transporters) (Zhao y Wang, 2020). Las invertasas de la pared celular convierten la sacarosa en glucosa y fructosa extracelularmente, donde la glucosa producida puede interactuar con el regulador de la proteína G (RGS1) para inducir la autofagia mediante un mecanismo aún no caracterizado. A su vez, la autofagia ayuda a eliminar el exceso de azúcar del citosol, regulando así el nivel de azúcares disponibles (Janse van Rensburg et al., 2019; Signorelli et al., 2019; Zhao y Wang, 2020). La glucosa puede activar la señalización de TOR indirectamente mediante la inactivación de la cinasa sensora de glucosa/energía conservada SnRK1 (Sucrose non-fermenting-1 (SNF1)-related protein kinases) en plantas (ortóloga de AMPK en mamíferos). En Arabidopsis, las

subunidades catalíticas de SnRK1, codificadas por KIN10 y KIN11 (SNF1-related protein kinase catalytic subunit alpha 10 y 11), son inhibidas por la glucosa, pero activadas por inanición, falta de energía y estrés abiótico (Shi et al., 2018).

Las auxinas son fitohormonas esenciales que orquestan una amplia gama de procesos de crecimiento y desarrollo vegetal, incluyendo la división celular, la elongación y la diferenciación (Teale et al., 2006). Estas fitohormonas activan la proteína TOR (Beltrán-Peña et al., 2002; Schepetilnikov et al., 2013; Turck et al., 2004; Rabeh et al., 2024). En contraste con las auxinas, el ABA reprime la activación de TOR y activa a la proteína SnRK2 (SNF1-related protein kinase 2) durante condiciones de estrés (Wang et al., 2018).

Las plantas no poseen homólogos de los sensores de aminoácidos, pero estos activan TOR, lo que sugiere la existencia de transportadores-sensores de aminoácidos específicos de plantas aún por identificar (Shi et al., 2018). También TOR es activada por nutrientes esenciales como el nitrógeno (N), el fósforo (Pi) y el azufre (S) que son cruciales para el crecimiento y desarrollo vegetal. Por ejemplo, la disponibilidad de azufre coordina la activación de TOR por la glucosa. El nitrato, una fuente de nitrógeno, actúa como señal para promover el crecimiento de brotes y raíces, y la sobreexpresión de TOR confiere hiposensibilidad a la inhibición del crecimiento de raíces por altos niveles de nitrato (Shi et al., 2018).

La aplicación de H_2O_2 a plantas de *Arabidopsis* aumentó la expresión del gen *RPS27B* (Small Ribosomal Subunit Protein 27) asociado con la biogénesis de ribosomas, lo que sugiere la activación de la vía TOR por EROs. Esta relación fue respaldada por el tratamiento con el inhibidor de TOR, Torin2, que suprimió eficazmente la expresión de *RPS27B* inducida por H_2O_2 (Hernández-Esquível et al., 2024).

3.5.3. Componentes río debajo de la ruta TOR en plantas

Uno de los sustratos posteriores de TOR, es la proteína cinasa ribosomal S6 de la subunidad 40S. *Arabidopsis* posee dos genes homólogos de la proteína cinasa S6 (S6K) de animales, conocidos como AtS6K1 y AtS6K2. La cinasa TOR puede fosforilar S6K1 y S6K2 en (Thr; treonina) Thr449 y Thr455, respectivamente,

estableciéndose como un sustrato común para examinar la actividad de TOR (Xiong y Sheen, 2015; Van Leene et al., 2019). Tras la estimulación con auxina, TOR fosforila S6K1, lo que conduce a la fosforilación del factor 3 de iniciación eucariótica (eIF3h) y activa la reiniciación de la traducción de los factores de respuesta a la auxina (ARF) (Schepetilnikov et al., 2013; Shi et al., 2018).

Tap42/a4 (Type 2A phosphatase-associated protein 42/a4 en levaduras y mamíferos) y su homólogo vegetal TAP46 son subunidades reguladoras de la proteína fosfatasa PP2A y efectores dependientes de TOR. TOR fosforila directamente a TAP46 para inhibir la actividad de PP2A, la cual regula procesos cruciales como la expresión génica sensible al estrés, la autofagia, el metabolismo del nitrógeno y la traducción de proteínas, coordinando así el crecimiento celular con las condiciones ambientales y nutricionales (Ahn et al., 2011; Xiong y Sheen, 2015; Zhao y Wang, 2020).

La fosforilación directa de E2Fa y E2Fb (Transcription factor E2Fa y b) por TOR activa la transcripción de genes de la fase S (fase de síntesis), lo que a su vez estimula el meristemo radicular, el rápido crecimiento de la raíz, la proliferación de primordios foliares y la embriogénesis (Xiong et al., 2013; Li et al., 2017).

En mamíferos, la vía mTOR-S6K1 regula la biosíntesis de lípidos y la vía de las pentosas fosfato al estabilizar la forma activa de SREBP (Sterol Regulatory Element-Binding Protein) (Düvel et al., 2010). Además, mTOR fosforila directamente a la fosfatidato fosfatasa LPIN1 (Lipin 1), un supresor de SREBP, para prevenir su translocación nuclear y la inactivación de SREBP (Peterson et al., 2011). Aunque las plantas carecen de ortólogos de SREBP, se han identificado dos homólogos de LPIN1 en *Arabidopsis*, AtPAH1 y AtPAH2, que codifican fosfatidato fosfatasas 1 y 2 respectivamente (Nakamura et al., 2009; Shi et al., 2018).

Se ha demostrado que las proteínas ATG1 y ATG13 (Autophagy related1 y 13) de *Arabidopsis thaliana* interactúan para formar un complejo regulador de la autofagia. La sensibilidad de este complejo a los niveles de nutrientes apunta hacia una posible

regulación por la vía de señalización TOR (Suttangkakul et al., 2011; Marshall y Vierstra, 2018).

El ABA induce la fosforilación de RAPTOR1 mediante la activación de SnRK2, lo que provoca su separación del complejo AtTORC1. Esta disociación reduce la fosforilación de TOR, lo que a su vez potencia la señalización del receptor de ABA (PYL) en las respuestas al estrés y disminuye la inhibición de los receptores de ABA (Wang et al., 2018; Shi et al., 2018).

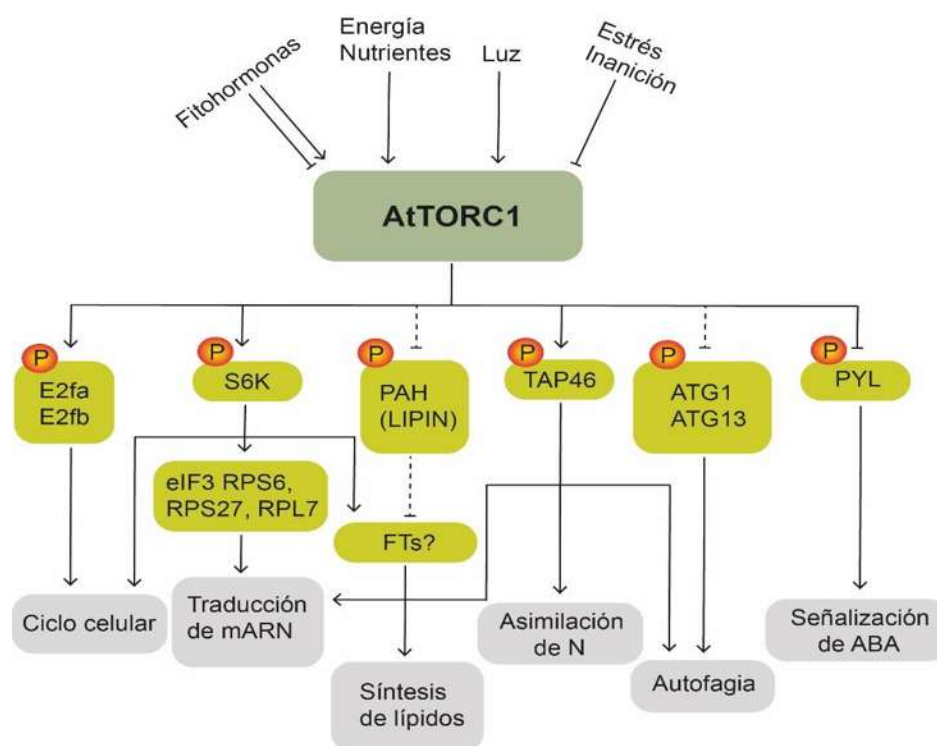


Figura 7. Vía de señalización de AtTOR.

Diversas señales ambientales regulan el complejo TOR para controlar distintos procesos involucrados en el crecimiento y desarrollo de las plantas. FT: Factores de transcripción. Modificada de Shi et al. (2018).

Mei2p (RNA-binding protein involved in meiosis) es otro sustrato de TOR, presente en plantas y muchos hongos, pero no en animales. Mei2p es una proteína de unión al ARN y un factor específico involucrado en la alteración del destino celular. TOR suprime el desarrollo meiótico mediante la fosforilación de Mei2p (Watanabe y Yamamoto, 1994; Otsubo et al., 2014; Dobrenel et al., 2016; Zhao y Wang, 2020).

La vía de señalización TOR ejerce una influencia considerable en la transcripción y traducción, procesos fundamentales para mantener la homeostasis celular. Se sugiere que TOR regula la disponibilidad de nucleótidos, cruciales para la expresión génica, optimizando así la transcripción. Además de su papel en el ciclo celular, TOR coordina la transcripción del ARNr, la activación de genes de proteínas ribosómicas, el ensamblaje de ribosomas y la regulación dinámica de la traducción, actuando como un regulador central de la expresión génica. La inhibición de TOR mediante Torin2 provoca una reducción en los niveles de ARNm de las proteínas ribosómicas en cloroplastos, citosol y mitocondrias, lo que resalta la implicación de TORC1 en la regulación de la traducción a través de su participación en la biogénesis ribosómica (Scarpin et al., 2020; Dobrenel et al., 2016; Rabeh et al., 2024)

3.5.4. Activación de mTOR por el Ácido fosfatídico

En mamíferos, se ha demostrado la participación del AF en la regulación de mTOR. Fang et al. (2001) reportaron que la administración exógena de AF a células embrionarias de riñón humano HEK293 estimuló la activación de la S6 cinasa (S6K), un sustrato de mTOR, y la fosforilación de factor de iniciación eucariota 4E-1 (4E-BP1), otra proteína sustrato de mTOR. Este efecto del AF fue sensible a la rapamicina y depende completamente de la suficiencia de aminoácidos. Por lo tanto, el AF puede gobernar la señalización paralela a la vía de detección de aminoácidos. Aunque el AF puede imitar a los mitógenos en la activación de la señalización descendente de mTOR, PI3K no se activa en las células tratadas con AF (Chen y Fang, 2002).

El dominio FRB de mTOR se une al AF. Similar a otras proteínas que interactúan con AF, la unión parece involucrar interacciones electrostáticas, ya que una alta fuerza iónica disminuye parcialmente la afinidad. El residuo (Arginina) ARG2109, se identificó como importante para la unión de AF (Chen y Fang, 2002). Cabe destacar que este sitio está altamente conservado evolutivamente, con una Arg o Lys (Lisina) en este sitio en una amplia variedad de especies, desde la levadura hasta humanos (Foster, 2013).

Inicialmente, el descubrimiento de la asociación entre AF y mTOR llevó a considerar que el AF podría anclar mTOR a la membrana celular. Sin embargo, experimentos posteriores demostraron que una mutante de mTOR en el dominio FRB se asociaba a las membranas celulares en un grado similar al de la proteína WT, descartando esta posibilidad. En contraste, en levaduras, los motivos HEAT de Tor2p son conocidos por su función en el anclaje a la membrana. Por lo tanto, el AF regula la señalización de TOR a través de una vía diferente al control de la localización de mTOR en la membrana (Chen y Fang, 2002).

Se ha documentado que especies moleculares de AF con cadenas de ácidos grasos insaturados, como las producidas por PLD, son capaces de desplazar a la proteína que interactúa con mTOR que contiene el dominio DEP (DEPTOR) y activar a mTORC1, con alta afinidad por el dominio FRB de mTOR. Esto revela un mecanismo de regulación de mTOR y proporcionan una explicación molecular de la especificidad de la función de AF (Yoon et al., 2015).

3.5.5. Participación de TOR en el desarrollo de las plantas

A diferencia de otros organismos las plantas perciben la calidad y cantidad de luz para generar metabolitos de carbono y determinar si almacenan los azúcares producidos en las hojas o los distribuyen a otros órganos como brotes jóvenes, raíces o semillas (Dobrenel et al., 2016). Por lo tanto, las plantas han desarrollado mecanismos para detectar y responder a las diversas señales externas, coordinando así su crecimiento multicelular de manera precisa (McCready et al., 2020). En este contexto, la señalización de TOR funciona como un regulador central al integrar señales nutricionales y orquestando múltiples etapas del ciclo de vida vegetal, desde la embriogénesis y la activación del meristemo, hasta el crecimiento de raíces y hojas, así como la floración, la senescencia y la determinación de la longevidad (Fu et al., 2020).

Durante el desarrollo de las plantas, la división celular se encuentra limitada a regiones específicas llamadas meristemos. Estos meristemos, que se forman durante la embriogénesis, permanecen activos a lo largo de la vida de la planta, permitiendo el crecimiento continuo. Como resultado, el cuerpo vegetal adulto se

convierte en una mezcla de tejidos embrionarios (meristemos) y tejidos maduros (Krishnamurthy et al., 2015). El meristemo apical del brote (SAM) y el meristemo apical de la raíz (RAM) son responsables del crecimiento de los órganos aéreos y subterráneos, respectivamente. La proliferación celular en ambos meristemos es esencial para el crecimiento y la producción de órganos nuevos, y está estrictamente controlada por señales internas de desarrollo, nutrientes, hormonas y señales ambientales externas (Li et al., 2016). En *Phaseolus vulgaris*, TOR presenta niveles más altos de transcripción en los meristemos de la raíz (Nanjareddy et al., 2016). Mientras tanto en *Arabidopsis thaliana*, la expresión de TOR se localizó principalmente en regiones con alta actividad celular, como los meristemos SAM y RAM, lo anterior sugiere su implicación en la división celular (Menand et al., 2002). Además, se ha reportado que la división celular en el SAM requiere tanto señales de glucosa como de luz, mientras que en el RAM depende únicamente de la señalización energética proporcionada por la glucosa (Li et al., 2017). TOR es activada por la glucosa generada durante la fotosíntesis y desempeña un papel importante en el desarrollo de los pelos radiculares (Xiong y Sheen, 2015; Zhao y Wang, 2020).

Existe una correlación positiva entre los niveles de expresión de TOR y el crecimiento de las plantas. Por ejemplo, la sobreexpresión de AtTOR provocó un aumento en el tamaño de las células y en órganos, mientras que la mutación de este gen bloqueó el desarrollo embrionario en la etapa de 16-32 células (Menand et al., 2002; Deprost et al., 2007; Rabeh et al., 2024). Asimismo, la sobreexpresión de AtTOR completo o del dominio cinasa produce anomalías en el desarrollo en el SAM y el RAM, en el tallo, el tiempo de floración y en la senescencia (Ren et al., 2011). Todos estos resultados sugieren que la regulación temporal y espacial de la expresión de TOR es crucial para el crecimiento y el desarrollo de las plantas (Xiong y Sheen, 2015; Zhao y Wang, 2020).

4. JUSTIFICACIÓN

Los lipopolisacáridos de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 participan en la estimulación del crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis thaliana* por mecanismos que hasta ahora son pocos conocidos. Uno de los elementos involucrados en el crecimiento y desarrollo de las plantas es la fosfolipasa D, cuya función es hidrolizar a fosfolípidos de la membrana generando ácido fosfatídico como segundo mensajero, regulador de diversas proteínas cinasas. Por otra parte, la cinasa TOR integra varias señales para coordinar el crecimiento celular. El estudio de los LPS de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 sobre la actividad de esta enzima y su relación con la proteína TOR durante la promoción del crecimiento de *Arabidopsis thaliana* nos permitirá entender algunos de los mecanismos moleculares involucrados en los efectos benéficos de esta rizobacteria.

5. HIPÓTESIS

Los lipopolisacáridos de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 promueven el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* a través de la activación de la vía de TOR mediada por la fosfolipasa D.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de los lipopolisacáridos de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 sobre la actividad de la fosfolipasa D y su relación con la proteína TOR en *Arabidopsis thaliana*.

6.1.1. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto de los LPS de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 en la actividad de la PLD de *Arabidopsis thaliana*.
2. Dilucidar la participación de la PLD en el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*.
3. Conocer el efecto de los LPS de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 y del ácido fosfatídico en la expresión y en la actividad de ATOR.
4. Identificar la isoforma de PLD involucrada en las vías de señalización relacionadas a la promoción de crecimiento por los LPS de *Azospirillum baldaniorum* Sp245
5. Conocer el efecto del H₂O₂ como molécula señalizadora en la modulación de TOR.

7. RESULTADOS

Los principales resultados obtenidos en este proyecto de tesis se presentan en los capítulos 1 y 2.

Capítulo 1: Phospholipase D is required for the activation of target of rapamycin (TOR) signaling in *Arabidopsis thaliana* by lipopolysaccharides from *Azospirillum baldaniorum* Sp245.

Capítulo 2: Hydrogen peroxide modulates the expression of the target of rapamycin (TOR) and cell division in *Arabidopsis thaliana*.

Capítulo 3: Resultados adicionales

Capítulo 3.1. La inoculación con *Azospirillum baldaniorum* Sp245 promueve la acumulación de ácido ascórbico, y disminuye la expresión de la cinasa TOR y la división celular en la raíz de *Arabidopsis*.

Capítulo 3.2. Lipopolisacáridos: Moléculas clave en las interacciones bacterianas.

Capítulo 3.3. Molecular Signals and Elicitors in *Azospirillum*-Plant Interactions.

Capítulo 3.4. PLD α 1 improves saline stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* inoculated with *Azospirillum baldaniorum* Sp245.

Capítulo 3.5. The growth promotion of *Arabidopsis thaliana* by *Serratia* Sp. H6 requires the metabolic stress sensor SNF1-related protein kinase 1 (SnRK1).

7.1. CAPÍTULO 1. Phospholipase D is required for the activation of target of rapamycin (TOR) signaling in *Arabidopsis thaliana* by lipopolysaccharides from *Azospirillum baldaniorum* Sp24.

Plant Science

Phospholipase D is required for the activation of target of rapamycin (TOR) signaling in *Arabidopsis thaliana* by lipopolysaccharides from *Azospirillum baldaniorum* Sp245.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Keywords:	Phosphatidic acid; Phospholipase D; 1-butanol; root meristem; cell division
Corresponding Author:	Ernesto Garcia-Pineda, Ph.D. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo Instituto de Investigaciones Químico Biológicas Morelia, Michoacan MEXICO
First Author:	Alma Alejandra Hernández-Esquivel, MS
Order of Authors:	Alma Alejandra Hernández-Esquivel, MS Elda Castro-Mercado, MS Idolina Flores-Cortez, Dr Eduardo Valencia-Cantero, Dr José López-Bucio, Dr Homero Reyes-de la Cruz, Dr Ernesto Garcia-Pineda, Ph.D.
Abstract:	Phospholipase D (PLD) metabolizes phospholipids in the cell membrane to produce phosphatidic acid (PA), a second messenger involved in activating signaling pathways related to developmental processes. This study investigated the effect of <i>A. baldaniorum</i> lipopolysaccharides (LPS) on PLD activity and its relationship with the Target of Rapamycin (TOR) signaling pathway during the growth promotion of <i>A. thaliana</i> . Treatment with LPS (100 µg/mL) increased PLD activity with 5 minutes, with a more pronounced effect observed at 30 minutes. PA content also increased in parallel with PLD activity, reaching its peak at 30 minutes. LPS failed to promote growth in the <i>xip1</i> mutant, which is defective in phosphocholine biosynthesis, a precursor of PA. The LPS-stimulated accumulation of PA was inhibited by 1-butanol, a PLD activity inhibitor. The increase in TOR expression induced by LPS treatment was also inhibited by 1-butanol. Exogenous application of various PA species (e.g., 16:0, 18:0, and 18:1) increased TOR expression, with unsaturated PA (18:1) demonstrating the highest biological potency. LPS treatment further increased the expression of ribosomal genes RPS27B (Small Ribosomal Subunit Protein 27B) and RPL7B (Large Ribosomal Subunit Protein L7B), but not RPS6B (Ribosomal Protein 6S). Cell division in the root meristem was stimulated by the application of different PA species, with PA 18:1 showing the strongest effect. These results highlight the role of PLD activity as a modulator of <i>Arabidopsis</i> TOR signaling in response to <i>A. baldaniorum</i> Sp245 LPS.

01/29/2025

Raquel Chan
Editor-in Chief
Plant Science

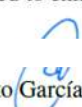
Dear Editor

I am pleased to submit for your consideration our experimental article “**Phospholipase D is required for the activation of target of rapamycin (TOR) signaling in *Arabidopsis thaliana* by lipopolysaccharides from *Azospirillum baldaniorum* Sp245**”. While numerous studies have examined plant responses to lipopolysaccharides (LPS) from pathogenic bacteria, primarily focusing on activated defense pathways, research on plant responses to LPS from beneficial bacteria remains limited. The signaling pathways involved in these beneficial interactions are largely unknown.

In this manuscript, we report the effects of LPS from the rhizobacterium *Azospirillum baldaniorum* Sp245 on phospholipase D (PLD) activity and its catalytic product, phosphatidic acid (PA), in relation to the Target of Rapamycin (TOR) protein, a key regulator of organismal growth, including in plants. While the PLD-PA-TOR relationship is well established in mammals, it has not yet been reported in plants. We believe these findings will be of great interest to the readers of *Plant Science*.

All authors have contributed to the development of this manuscript and have approved the final version.

I extend my best regards and remain available for any clarifications or revisions that may be required to enhance the manuscript.



Ernesto García Pineda
egpineda@umich.mx

HIGHLIGHTS

- The PLD activity in *A. thaliana* was stimulated by LPS from *A. baldaniorum*.
- The LPS of *A. baldaniorum* increased PA levels in *A. thaliana*.
- PA biosynthesis is required for TOR expression.
- LPS and PA increased cell division in the root meristem of *A. thaliana*.
- LPS stimulate S6K1 activity and increase the expression of ribosomal genes.

1 **Phospholipase D is required for the activation of target of rapamycin (TOR) signaling**
2 **in *Arabidopsis thaliana* by lipopolysaccharides from *Azospirillum baldaniorum* Sp245.**

3

4 Alma Alejandra Hernández-Esquivel, Elda Castro-Mercado, Idolina Flores-Cortez, Eduardo
5 Valencia-Cantero, José López-Bucio, Homero Reyes-de la Cruz, Ernesto García-Pineda*

6

7

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

10

11

12

13

14 Corresponding author:

15 * Ernesto García-Pineda

16 Email: egpineda@umich.mx

17 **ABSTRACT**

18

19 Phospholipase D (PLD) metabolizes phospholipids in the cell membrane to produce
20 phosphatidic acid (PA), a second messenger involved in activating signaling pathways
21 related to developmental processes. This study investigated the effect of *A. baldamiorum*
22 lipopolysaccharides (LPS) on PLD activity and its relationship with the Target of Rapamycin
23 (TOR) signaling pathway during the growth promotion of *A. thaliana*. Treatment with LPS
24 (100 µg/mL) increased PLD activity with 5 minutes, with a more pronounced effect observed
25 at 30 minutes. PA content also increased in parallel with PLD activity, reaching its peak at
26 30 minutes. LPS failed to promote growth in the *xipol1* mutant, which is defective in
27 phosphocholine biosynthesis, a precursor of PA. The LPS-stimulated accumulation of PA
28 was inhibited by 1-butanol, a PLD activity inhibitor. The increase in TOR expression induced
29 by LPS treatment was also inhibited by 1-butanol. Exogenous application of various PA
30 species (*e.g.*, 16:0, 18:0, and 18:1) increased TOR expression, with unsaturated PA (18:1)
31 demonstrating the highest biological potency. LPS treatment further increased the expression
32 of ribosomal genes *RPS27B* (Small Ribosomal Subunit Protein 27B) and *RPL7B* (Large
33 Ribosomal Subunit Protein L7B), but not *RPS6B* (Ribosomal Protein 6S). Cell division in
34 the root meristem was stimulated by the application of different PA species, with PA 18:1
35 showing the strongest effect. These results highlights the role of PLD activity as a modulator
36 of Arabidopsis TOR signaling in response to *A. baldamiorum* Sp245 LPS.

37

38 **Key words:** Phosphatidic acid, Phospholipase D, 1-butanol, root meristem, cell division

39

40

41 **ABBREVIATIONS**

42 LPS, lipopolysaccharides; PLD, phospholipase D; PC, phosphatidylcholine, PA:
43 phosphatidic acid, TOR, Target of rapamycin; S6K, ribosomal protein S6 kinase; *RPS27B*,
44 small ribosomal protein 27B, *RPL7B*, large ribosomal protein L7B.

45

1. INTRODUCTION

Plant roots are profoundly influenced by rhizosphere microorganisms (Verbon and Liberman, 2016) through the perception or detection of low-molecular-weight compounds, such as lipid molecules, released by microbes (Venturi and Keel, 2016). Perception of these compounds trigger regulatory or signaling cascades that elicit various responses in the root and influence the entire plant. However, the regulatory networks within plant cells that modulate plant growth in response to beneficial bacteria remain largely unknown.

The bacterium *Azospirillum baldaniorum* Sp245 (formerly known as *Azospirillum brasilense* Sp245) is recognized as a plant growth-promoting rhizobacterium due to its ability to fix atmospheric nitrogen and produce beneficial compounds for plants (Dos Santos Ferreira et al., 2020). Lipopolysaccharides (LPS) constitute major components of the outer bacterial membrane, playing crucial roles in the survival and interactions of rhizobacteria with other organisms (Molinaro et al., 2009). Recently, research has highlighted the involvement of LPS from this bacterium in stimulating plant growth (Chávez-Herrera et al., 2018; Méndez-Gómez et al., 2020; Tkachenko et al., 2021). In addition, Evseeva et al., 2011 provided evidence of LPS as an active component of *Azospirillum* in stimulating cellular responses in plants. They show that wheat root treated with $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ of Sp245 lipopolysaccharides increased the mitotic index, and that these increases were comparable to the effects produced by whole cell inoculation. LPS were also able to enhance the morphogenetic activity of wheat somatic tissues, suggesting that plants can recognize lipopolysaccharides of associative bacteria (Evseeva et al., 2018). Lately, Méndez-Gómez et al., 2020 showed that the biological activity of LPS could be modulated through the Target of Rapamycin (TOR) signaling pathway in *Arabidopsis*. They show that LPS addition to root plants increased the expression

70 of TOR and the phosphorylation of S6k protein, a downstream target of TOR. These
71 responses were inhibited by the TOR inhibitor AZD-8055. However, the mechanism by
72 which LPS can activate this important signaling pathway is unknown. TOR, a highly
73 conserved protein kinase across yeast, plants, and mammals, integrates diverse
74 environmental cues to regulate metabolism and gene expression, thereby facilitating cell
75 proliferation, growth, and development (Fang et al., 2001).

76 The plasma membrane (PM) plays a pivotal role in signaling responses to external stimuli
77 and in the initial recognition of microbes (Elmore and Coaker, 2011; Rossi et al., 2020).
78 Lipids, as major components of the PM, establish physical barriers on cell surfaces, regulate
79 communication between hosts and microbes, and act as signaling molecules or elicitors for
80 recognition, thus influencing the establishment or prevention of microbial colonization (van
81 Dam and Bouwmeester, 2016; Venturi and Keel, 2016). The phospholipids are the main
82 lipids present in the PM which can be hydrolyzed by a group of enzymes known as
83 phospholipases (PL), including PLA, PLC, and PLD (Zien et al., 2001). In *Arabidopsis*
84 *thaliana*, the PLD family encompasses 12 characterized isoforms: PLD α (1, 2, and 3), β (1
85 and 2), γ (1, 2, and 3), ϵ , and ζ , distinguished by their sequences, protein structures, and
86 distinctive properties governing activity and phospholipid preferences (Ali et al., 2022).
87 Through PLD activity, phospholipids are metabolized to generate phosphatidic acid (PA), a
88 crucial messenger lipid pivotal in cell growth, proliferation, development, and responses to
89 various stresses such as drought, salinity, frost, and nutrient deficiency. PA exerts its
90 influence on cellular processes via diverse mechanisms, including direct binding to target
91 proteins and biophysical effects on cell membranes (Hong et al., 2008; Li et al., 2009).
92 In mammals, one of the biochemical responses activated by PA is the TOR pathway. In
93 plants, PLD α 3 has been shown to stimulate the phosphorylation of ribosomal kinase S6k,

94 particularly under conditions of hyperosmotic and salt stress, potentially mediated by PA-
95 triggered activation of TOR (Hong et al., 2008).

96 This study addressed whether the activation of the TOR pathway in *A. thaliana* by LPS of *A.*
97 *baldaniorum* Sp245 is mediated by PLD activity. These findings will provide valuable
98 insights into the molecular mechanisms behind the beneficial effects of this rhizobacterium
99 on plant growth.

100

101 2. MATERIALS AND METHODS

102

103 The bacterium *Azospirillum baldaniorum* Sp245 was kindly donated by Dr. Gladys
104 Alexandre (University of Tennessee, USA). The strain was maintained on solid LB medium
105 at pH 7, composed of 10g/L peptone, 5g/L yeast extract, 5g/L NaCl, supplemented with
106 0.3009 g/L MgSO₄ and 0.277 g/L CaCl₂, and 15g/L agar. All reagents were purchased from
107 the Sigma-Aldrich brand (St. Louis, Missouri, USA).

108 For this study *Arabidopsis thaliana* plants ecotype Columbia-0, the reporter lines TOR::GUS
109 (TOR/tor-1 Menand et al., 2002) , pCycB1;1::uidA (Colon-Carmona et al., 1999), the *xipotl*
110 mutant, which is affected in the phosphatidylcholine biosynthesis (Cruz-Ramírez et al., 2004)
111 and the S6K1 overexpression line (Mahfouz et al., 2006) were used.

112

113 2.1. Seed germination

114

115 Seeds were sterilized by immersion in 95% (vol/vol) ethanol for 5 minutes, followed by 20%
116 (vol/vol) sodium hypochlorite for 5 minutes and three subsequent washes with sterile distilled
117 water. To synchronize germination, the seeds were cold-stratified at 4°C for 48 hours before

118 being placed on agar plates containing Murashige and Skoog (MS) medium at 0.2X
119 concentration, pH 7, supplemented with 0.9 g/L MS salts, 0.6% (w/v) sucrose, and 10 g/L
120 plant agar (PhytoTechnology Laboratories, St. Lenexa, KS, USA). These plates were
121 vertically positioned inside a growth chamber (Percival Scientific AR-95L) maintained at a
122 temperature of 22°C under a photoperiod of 16 hours light and 8 hours darkness.

123

124 **2.2. Lipopolysaccharides extraction**

125

126 Lipopolysaccharides were extracted using the hot phenol method as described by Renukadevi
127 et al., 2012. The bacteria were cultured in 150 mL of liquid LB minimal medium for 24 hours
128 at 30°C with continuous shaking. Following incubation, the culture was centrifuged at 3,200
129 rpm for 10 minutes (Centra CL2 centrifuge, rotor 800) to obtain a cell pellet. To this pellet,
130 5 mL of sterile distilled water and 5 mL of phenol equilibrated with 10 mM Tris-HCl at pH
131 8 were added, and the mixture was incubated at 65°C for 20 minutes with shaking at 80 rpm.
132 After incubation, the sample was allowed to rest at 4°C for 24 hours and then centrifuged at
133 4,300 rpm for 10 minutes. The resulting supernatant was collected and placed onto a cellulose
134 dialysis membrane (flat width 33 mm), followed by dialysis in deionized water for 72 hours
135 with water changes every 24 hours. Subsequently, the dialyzed sample was centrifuged at
136 12,000 rpm for 10 minutes. To the resulting supernatant (dialyzed sample), 96% ethanol and
137 sodium acetate were added to achieve a final concentration of 0.15 M at a ratio of 1:4. This
138 mixture was allowed to rest for 24 hours at -20°C and then centrifuged for 20 minutes at
139 4,300 rpm. The supernatant was discarded, and the pellet (precipitate) was dissolved in 250
140 µL of sterile distilled water. The extracted lipopolysaccharides were stored at 4°C until
141 further use.

142

143 **2.3. Treatment of plants with LPS or PA**

144

145 After 3 days of germination, the plants were transferred to MS medium plates supplemented
146 with various concentrations of LPS (50, 100, and 150 µg/mL). The plants were allowed to
147 grow for 7 days, after which growth parameters were recorded. For phosphatidic acid (PA)
148 treatment, three different PAs were utilized: 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate sodium
149 salt (16:0) (Sigma-Aldrich), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphate sodium salt (18:0), and
150 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphate (18:1^{Δ9}) (Avanti). These PAs were prepared in
151 liposomal form following the protocol outlined by Potoky et al., 2003. They were dissolved
152 in chloroform/methanol (2:1, v/v), and the solvent evaporated under a stream of N₂.
153 Subsequently, water was added, and the mixture was dispersed by sonication in a water bath
154 (Cole-Parmer 8893 Ultrasonic cleaner). Liposomes were either used immediately or stored
155 at -20°C until needed.

156

157 **2.4. PLD activity**

158

159 PLD activity was assessed using the MAK137 colorimetric kit (Sigma-Aldrich). In this assay,
160 PLD catalyzes the hydrolysis of phosphatidylcholine to choline, which is subsequently
161 detected using choline oxidase. The resulting colorimetric product is quantified via
162 spectrophotometry at 570 nm.

163

164 **2.5. PA extraction**

165

166 PA content was analyzed via lipid extraction using a modified procedure developed by Welti
167 et al., 2002. Initially, 500 mg of tissue were transferred to 10 mL of isopropanol containing
168 0.01% butylated hydroxytoluene (BHT) and heated at 75°C for 15 minutes. Subsequently,
169 10 mL of chloroform and 5 mL of water were added, and the samples were stirred for one
170 hour at room temperature before removing the supernatant. This supernatant was then
171 combined with chloroform/methanol (2:1) containing 0.01% BHT and stirred for an
172 additional 30 minutes at room temperature. The resulting supernatant was collected in a pre-
173 weighed tube, and this process was repeated 5 times until the plant tissue appeared white,
174 with each supernatant being added to the same tube. A wash was performed with 1 mL of
175 1M KCl for 10 minutes, followed by removal of the upper phase of the mixture, and another
176 wash with 2 mL of water for 5 minutes. The aqueous phase (upper phase of the mixture) was
177 discarded. The solvent then evaporated under a stream of N₂ gas, and the dry extract was
178 dissolved in 200 µL of chloroform and stored at -20°C until further use.

179

180 **2.6. Thin-layer chromatography of PA**

181

182 Lipid separation was conducted using thin-layer chromatography (TLC) employing the
183 solvent system chloroform:methanol:ammonium hydroxide (CHCl₃:CH₃OH:NH₄OH,
184 60:35:6 v/v/v). For phospholipid visualization, the plate was sprayed with 0.01% primuline
185 in 80% acetone (Tanaka et al., 2012). Subsequently, the dried plate was examined under a
186 transilluminator (excitation wavelength: 312 nm, emission wavelength: 605 nm), and
187 photographs were captured. The digitized image was subjected to analysis using ImageJ
188 software to determine both the pixel intensity value and the area of the stain corresponding
189 to phosphatidic acid.

190

191 **2.7. TOR expression**

192

193 Plants expressing the uidA reporter gene were stained with 0.1% X-Gluc (5-bromo-4-chloro-
194 3-indolyl-beta-D-glucuronic acid) and incubated overnight at 37°C. For analysis, the plants
195 were cleared as previously described (Malamy and Benfey, 1997), subsequently mounted on
196 glass slides, and sealed with commercial nail polish. Observation was conducted under a
197 microscope equipped with Nomarski optics (Leica DFC450C). Image intensity was
198 quantified using the ImageJ program.

199 The *in silico* analysis of the phosphatidic acid-binding site of the TOR protein in plants was
200 conducted using the conserved Arg2109 residue of the human TOR protein (Foster, 2013).

201 The analysis was performed on the Protein BLAST platform provided by the National Center
202 for Biotechnology Information (NCBI), National Library of Medicine, USA.

203

204 **2.8. Cell division**

205

206 Cell division was analyzed in root meristem by the expression of the reporter
207 CYCB1;1::GUS, using the transgenic plants pCycB1;1::uidA 24 h after LPS or PA
208 treatments.

209

210 **2.9. RT-qPCR of the *RPS27B*, *RPL7B* and *RPS6B* genes**

211

212 Plants were macerated in liquid nitrogen, and total RNA was extracted using TRIzol (Sigma
213 Aldrich), followed by DNase treatment to eliminate DNA residues. RNA integrity was

214 evaluated by electrophoresis on a 1% agarose gel at 90 V. The quality and quantity of RNA
 215 were assessed using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Rockford, IL,
 216 USA). cDNA synthesis was carried out according to the manufacturer's instructions of the
 217 SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR kit (Life Technologies/Gibco-
 218 BRL., Carlsbad, CA, USA). RT-qPCR was conducted in triplicate for each treatment and
 219 gene using the ABI StepOne™ System thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA,
 220 USA). The oligonucleotide sequences for the genes were obtained from Yun-Kyoung et al.,
 221 2014. For *RPS27B* (Small ribosomal subunit protein 27B), the forward primer sequence was
 222 5'-TTAGCTTCTTGCGAAGATGGTTCTTCAA-3' and the reverse primer sequence was
 223 5'-AGAATTGTCTGGCAGTTTCCGCACACCA-3'. For *RPL7B* (Large ribosomal subunit
 224 protein L7B), the forward primer sequence was 5'-
 225 CTCCACAGAGGATTCGGAAATGGTTGAG-3' and the reverse primer sequence was 5'-
 226 ACTCCTTCTCCTTCTCGGCATATTCCTT-3'. For *RPS6B* (Ribosomal protein S6), the
 227 forward primer sequence was 5'-CTGTTGTAGCAGCAGTGTCTATCGGA-3' and the
 228 reverse primer sequence was 5'-CAATGACCAAGTTAAGAACAGACAGGTCA-3'. RT-
 229 qPCR analysis was performed with SYBR-Green PCR master mix, 1 µL of oligonucleotide
 230 mix (forward-reverse), 2 µL of cDNA, and 3 µL of sterile deionized water. The thermal
 231 cycling protocol consisted of an initial denaturation step at 95°C for 10 min, followed by 40
 232 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds and annealing/extension at 70°C for 30
 233 seconds. The amount of RNA in each sample was normalized using actin as a reference gene.

234

235 2.10. Statistical analysis

236

237 All experiments were repeated at least three times. The data were analyzed using the
238 STATISTICA program, versión 12 a multivariate analysis was carried out followed by a
239 post-hoc test (Tukey's HSD) were used to test differences between treatments.

240

241 3. RESULTS

242

243 3.1. LPS increases leaf area and the number of lateral roots

244

245 Previous studies have demonstrated that LPS contributes to increased length and weight in
246 *Arabidopsis* seedlings (Méndez-Gómez et al., 2020). Additionally, here it is demonstrated
247 that LPS treatment also increase concentration-dependent the number of lateral roots (Figure
248 1A), the length of root hairs (Figure 1B), and the area of the first true leaf (Figure 1C), with
249 the most significant effects observed at a concentration of 100 µg/mL. Collectively, these
250 findings suggest that LPS play a role in stimulating the growth of *A. thaliana*, with a
251 concentration of 100 µg/mL showing the most pronounced effects, and this concentration
252 was used to further assays.

253

254 3.2. LPS stimulates PLD activity

255

256 To analyze whether the modulation of plant growth by LPS involves PLD activity, PLD
257 activity assays were conducted following varying exposure times to LPS (5, 10, 15, and 30
258 minutes). A significant increase in total PLD activity was observed after 5 minutes of LPS
259 treatment, with further increase evident at 30 minutes (Figure 2A). Subsequently, a detailed
260 analysis of PLD activity was carried out in both the shoot and root to investigate potential

261 differential responses to LPS in different tissues. These tissues exhibited different levels of
 262 PLD activity, with root activity notably higher. Post-LPS treatment, PLD activity increased
 263 in both the shoot and root at the same level (approximately 60%), indicating that LPS can
 264 stimulate PLD activity throughout the entire plant (Figure 2B). Furthermore, the total content
 265 of the second messenger PA, a product of PLD enzyme activity, was analyzed by TLC at the
 266 same times as with PLD activity assays. A correlation between PA accumulation and enzyme
 267 activity was observed, with an increase in time of LPS treatment with maximum
 268 accumulation reached at 30 minutes after treatment (Figure 2C). These results show that LPS
 269 possess the capability to elevate PA levels by activating PLD. When PA content was analyzed
 270 in the shoot and root, it was biologically higher in the shoot than in the root, indicating a
 271 greater production of PA in the shoot. The addition of LPS exerted stimulatory effects on PA
 272 accumulation in the two tissues, with similar magnitudes observed in both tissues (3-fold of
 273 increase) (Figure 2D).

274

275 3.3. Phosphatidylcholine synthesis is needed for the biological activity of LPS

276

277 The role of PA production stimulated by LPS in regulating plant morphology and growth
 278 was investigated using the *Arabidopsis* mutant *xipot1* (*xpl1*). This mutant is impaired in the
 279 production of phosphocholine (PCho), a precursor for the biosynthesis of
 280 phosphatidylcholine (PC), the primary substrate for PA production by the PLD enzyme. *xpl1*
 281 mutants exhibit reduced primary root growth and morphological alterations in root epidermal
 282 cells (Cruz-Ramírez et al., 2004). When *xpl1* plants were grown in the presence of LPS for
 283 seven days, root growth was not stimulated as observed in wild-type plants; instead, growth
 284 remained similar to that of untreated *xpl1* plants. Partial recovery of root growth was

285 observed with the addition of saturated PA species, particularly PA 16:0, followed by PA
286 18:0, and to a lesser extent, the unsaturated PA 18:1^{Δ9} (Figure 3A-C). Furthermore, root hair
287 formation, which was not stimulated in *xpl1* plants by LPS, was restored by the addition of
288 all three PA species (Figure 3D). The *xpl1* plants exhibited impaired PA production,
289 producing less than the WT plants, and the PA level was only partially restored with the
290 addition of LPS (Figure 3E). These findings highlight the critical role of PCCho as a precursor
291 for PA synthesis in the LPS-stimulated growth and morphological responses of *Arabidopsis*.

292

293 3.4. 1-butanol inhibit PA accumulation and TOR expression

294

295 The PLD inhibitor 1-butanol was utilized to investigate the role of PA in TOR expression.
296 Initially, the effects of various concentrations of 1-butanol on *Arabidopsis* growth (0.2, 0.4,
297 0.6, and 0.8%) were assessed. It was observed that both total length and total fresh weight
298 progressively decreased in parallel with increasing concentrations of 1-butanol. Cell viability
299 was notably affected only at the higher inhibitor concentration of 0.8% (Figure 4A-C). Based
300 on these findings, a concentration of 0.4% 1-butanol was selected for further analysis of TOR
301 expression in the root meristem, as this concentration inhibited plant growth without adverse
302 effects on cell viability (Supplementary Figure 1). TOR was found to be highly expressed in
303 the root meristem of plants treated with LPS (100 µg/mL). However, the inhibitor alone
304 suppressed basal TOR expression, with this inhibitory effect being sustained by the
305 combination of LPS/1-butanol (Figure 4D). The effect of 1-butanol on TOR expression
306 correlated with levels of PA (Figure 4E), indicating that the PA accumulation promoted by
307 LPS is required for TOR expression.

308

309 3.5. Effect of different PA species on TOR expression

310

311 Various chemical species of PA were used to investigate its specificity in regulating TOR
312 expression in shoots and roots. The study included two saturated fatty acids (16:0 and 18:0)
313 and one unsaturated fatty acid (18:1^{Δ9}). Two concentrations of each PA species (50 and 100
314 μM) were tested, along with three exposure times (30, 60, and 120 minutes), to evaluate their
315 effects on TOR marker expression (Supplementary Figure 2).

316 Interestingly, the different PA species exhibited concentration- and time-dependent effects
317 on TOR marker expression. The unsaturated PA (18:1^{Δ9}) demonstrated the strongest activity,
318 showing significant effects as early as 30 minutes and increasing further by 120 minutes at
319 100 μM. A similar concentration- and time-dependent pattern of TOR activation was
320 observed in shoot tissue (Figure 5A-C).

321 Our findings demonstrate that PA activates TOR expression. In mammals, the positively
322 charged Arg2109 in the rapamycin-binding domain of mTOR is critical for PA interaction,
323 and this residue is highly conserved, with either an Arg or Lys present at this site (Fang et
324 al., 2001; Rodríguez-Camargo et al., 2012). To assess whether this binding site is conserved
325 in the *Arabidopsis* TOR protein, we performed an *in silico* analysis. Interestingly, a
326 conserved Lys residue was identified at the PA-binding site of the TOR protein in
327 *Arabidopsis* and other plant species (Figure 5D). These results suggest that, in addition to
328 regulating its expression, PA may activate *Arabidopsis* TOR through a conserved mechanism
329 shared among plant species.

330

331 3.6. S6K1 and ribosomal genes are stimulated by LPS

332

333
334 S6K1 is a key downstream component in the TOR signaling pathway. To determine whether
335 LPS activates molecular elements downstream of TOR, we used an overexpression line of
336 the S6K1 protein (*35S::S6K1*) and quantified the expression of ribosomal genes (*RPS27B*,
337 *RPL7B*, and *RPS6B*). The *Arabidopsis* S6K1 overexpression plants displayed increased shoot
338 and root growth compared to wild-type plants. This growth was further enhanced by LPS
339 treatment, as evidenced by increases in total length and fresh weight parameters (Fig. 6A-C).
340 These results suggest that LPS appear to stimulate S6K1 activity. In addition, treatment with
341 LPS (100 µg/mL) resulted in a 1.07-fold increase in *RPS27B* expression and a 0.70-fold
342 increase in *RPL7B* expression compared to untreated plants. However, *RPS6B* expression
343 showed no significant changes in response to LPS (Fig. 6B).

344

345 3.7. Effect of LPS and PA on cell division

346

347 Finally, we then investigated the impact of LPS and PA on cell division in the root meristem
348 by assessing the expression of the reporter *CycB1;1::GUS*. Plants were treated for 24 hours
349 with LPS (100 µg/mL), PAs (100 µM), or 1-BtOH (0.04%), and the marker expression was
350 subsequently analyzed. An approximately 50% increase in cell division in response to LPS
351 treatment was observed compared to the untreated control. Furthermore, all three different
352 PAs promoted cell division, albeit with varying intensities; PAs 16:0 and 18:0 exhibited a
353 similar level of promotion as LPS, while PA 18:1^{Δ9} demonstrated a greater capacity to
354 enhance cell division compared to LPS and the other PAs. Notably, cell division was
355 inhibited by 1-butanol at this time point (Figure 7A, B).

356

357 4. DISCUSSION

358

359 Diverse studies have demonstrated that *A. baldaniorum* Sp245 LPS, in addition to serving as
360 structural components of the outer membrane, play a role in promoting plant growth (Evseeva
361 et al., 2011; Chávez-Herrera et al., 2018; Tkachenco et al., 2021). However, the underlying
362 mechanisms remain poorly understood. Méndez-Gómez et al., 2020 reported that LPS
363 treatment in seedlings increased the expression of the TOR protein and phosphorylation of
364 S6K, suggesting that the TOR signaling pathway may be modulated by LPS.

365 To further investigate this mechanism, we explored the potential role of PLD as a mediator
366 linking LPS to TOR activation. Our analysis revealed a significant increase in total PLD
367 activity shortly after LPS treatment, indicating that this enzyme is rapidly activated in
368 response to LPS and is integral to the plant response to this molecule. Moreover, we observed
369 a corresponding increase in PA levels shortly after LPS treatment, which was proportional to
370 PLD activity. PA, the direct product of PLD-mediated hydrolysis of membrane
371 phospholipids, functions as a signaling lipid. It regulates various cellular processes by
372 binding to specific target proteins, leading to either genomic (e.g., transcriptional changes)
373 or non-genomic responses (Kolesnikov et al., 2022).

374 We observed higher PLD activity in the root compared to the shoot of the plant, while PA
375 content was lower in the root and higher in the shoot. This elevated PA content in the shoot
376 may be due to a secondary pathway for PA production, potentially involving phospholipase
377 C (PLC) activity (Takác et al., 2019). While the role of phospholipases in plant growth is
378 well-established, their involvement in plant-microorganism interactions during growth
379 promotion remains basically underexplored.

380 The significance of PLD activity in mediating LPS biological effects on *A. thaliana* was
 381 confirmed using 1-butanol, an inhibitor of PA synthesis. PLD is unique in its ability to
 382 transfer the phosphatidyl group of phospholipids to primary alcohols, forming phosphatidyl
 383 alcohols (Munnik, 2001). We observed a dose-dependent reduction in the growth of *A.*
 384 *thaliana* with increasing concentrations of 1-butanol while treatments with ethanol and
 385 propanol will not affect plant growth (Supplementary Figure 1). Furthermore, the cellular
 386 and biochemical processes affected by 1-butanol, such as cell division and TOR expression,
 387 were not restored by LPS treatment. Previous studies have similarly reported poor root hair
 388 formation and disruptions in cytoskeleton organization in plants treated with 1-butanol,
 389 underscoring the critical role of PA in the normal development of *A. thaliana* (Motes et al.,
 390 2005; Potocký et al., 2003).

391 In mammals, Fang et al., 2001 demonstrated a key role for PA in mTORC1 regulation
 392 through direct binding to the FKBP12-rapamycin binding (FRB) domain of the TOR
 393 complex (Veverka et al., 2008). In plants, there is no direct evidence linking PA and TOR.
 394 However, our *in silico* analysis identified a conserved lysine residue within the PA-binding
 395 site of the TOR protein, strongly suggesting the possibility of a direct PA-TOR interaction
 396 in *Arabidopsis*. The high sequence conservation of FRB represents a positive regulatory
 397 function of this domain, exerted through PA (Foster, 2013; Frias et al., 2023). We also found
 398 that different PA species stimulated TOR expression in the shoot and root meristems,
 399 potentially also indicating TOR activation. Interestingly, the degree of fatty acid saturation
 400 in PA, rather than its molecular length, appeared to be more critical for TOR stimulation. For
 401 instance, PA 18:1^{Δ9} exhibited a greater capacity to enhance TOR marker expression
 402 compared to PA 16:0. Currently, there is no reported information on the relationship between
 403 PA saturation and TOR activation in plants, and such information is limited in mammals

404 (Foster, 2013). However, studies suggest that a certain degree of unsaturation in PA is
 405 necessary for TOR complex stability and activity. In mammals, PA containing only saturated
 406 fatty acids inhibits TOR (Zhang et al., 2012). In *Arabidopsis*, we observed that PA with two
 407 saturated fatty acids did not inhibit TOR expression but showed weaker biological activity
 408 compared to unsaturated PA.

409 S6 kinases (S6K) are major substrates of TOR kinase, conserved across animals and plants,
 410 with ribosomal protein S6 (RPS6) as their primary target (Fenton and Gout, 2011; Ruvisnky
 411 and Meyuhas, 2006). Using *Arabidopsis* plants overexpressing the S6K1 protein, we
 412 observed an additional growth stimulation compared to plants treated solely with LPS. These
 413 findings suggest that, in addition to TOR activation, S6K activity is also stimulated by LPS.
 414 S6K plays a critical role in regulating cell growth and proliferation (Schepetilnikov et al.,
 415 2011).

416 Ribosomal proteins such as RPS27B, RPL7B, and RPS6 are primarily involved in ribosome
 417 biogenesis. However, recent studies have demonstrated their additional roles in transcription,
 418 cell cycle regulation, and mRNA processing (Lindström, 2009; Warner and McIntosh, 2009).
 419 We evaluated the expression of these ribosomal components and found increased expression
 420 levels of *RPS27B* and *RPL7B*, but not *RPS6*, in *Arabidopsis* treated with LPS. Whether the
 421 regulation of these genes is directly or indirectly mediated by S6K remains to be determined.
 422 Changes in ribosomal gene expression can alter ribosome properties, impacting protein
 423 translation and, consequently, cell growth. Our results clearly indicate that ribosomal activity
 424 is modulated by LPS.

425 Interestingly, no increase in *RPS6* expression, a conserved downstream effector of the TOR
 426 (Target of Rapamycin) signaling pathway (Hay and Sonenberg, 2004; Chen et al., 2018), was

427 observed in response to LPS. However, its activation by TOR-dependent phosphorylation
428 has been reported by *A. baldaniorum* Sp245 LPS (Méndez-Gómez et al., 2020).
429 *RPS27* contains a zinc finger motif, which may allow it to interact with non-ribosomal
430 components such as DNA or mRNA. Specifically, *RPS27B* (*AT3G61110*) has been suggested
431 to regulate transcript stability in response to genotoxic stress (Revenkova et al., 1999).
432 Mammalian L7 proteins possess a basic-region leucine zipper (bZIP)-like motif (Hemmerich
433 et al., 1993), which mediates interactions with other components of the translational
434 apparatus, such as ZNF7-like proteins and S7. This enables L7 to regulate the translation of
435 its own mRNA and that of other genes (Witte and Krawinkel, 1997). In plants, the roles of
436 these ribosomal proteins, as well as others, in plant-beneficial microorganism interactions
437 have not been extensively studied. Our results suggest that they may play an important role
438 in such interactions, as LPS from *A. baldaniorum* stimulated their expression in *Arabidopsis*.
439 In conclusion, our findings demonstrate that *A. baldaniorum* LPS mechanistically stimulates
440 the TOR signaling pathway through PLD activity, and changes in ribosomal protein
441 expression associated with protein translation (model in Fig. 8).

442

443 **Acknowledgment**

444

445 We acknowledge MC Amanda Ortiz Calderon for her help with the manuscript edition.

446

447 **Author contribution statement**

448

449 AAHE conducted the experiments. ECM and IFC contributed with technical support to the
450 experiments. EGP conceived and designed the research. EGP and AAHE wrote the

--

451 manuscript. EVC, JLP, HRC supervised all the work done. All authors read and approved
452 the manuscript.

453

454 **Funding**

455

456 This study was supported by the CONACYT grant (606505) to AAHE and by the
457 Coordinación de la Investigación Científica from UMSNH to EGP.

458

459 **Conflicts of interest**

460

461 The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

462

463 **References**

464

465 Ali, U., Lu, S., Fadlalla, T., Iqbal, S., Yue, H., Yang, B., Hong, Y., Wang, X., Guo, L. 2022.

466 The functions of phospholipases and their hydrolysis products in plant growth,
467 development and stress response. Prog. Lipid. Res. 86:101158.
468 <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2022.101158>

469 Chávez-Herrera, E., Hernández-Esquivel, AA., Castro-Mercado, E., Garcia-Pineda, E. 2018.

470 Effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharides on wheat plant
471 development. J. Plant Growth Regul. 37, 859-866. [https://doi.org/10.1007/s00344-](https://doi.org/10.1007/s00344-018-9782-2)
472 018-9782-2

473 Chen, G., Liu, M., Xiong, Y., Sheen, J., and Wu, S. 2018. TOR and RPS6 transmit light
 474 signals to enhance protein translation in deetioliating *Arabidopsis* seedlings. *Proc.*
 475 *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, 12823-12828. <https://doi.org/10.1073/pnas.1809526115>

476 Colon-Carmona, A., You, R., Haimovitch-Gal, T., Doerner, P., 1999. Spatio-temporal
 477 analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J.* 20, 503-
 478 508. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.1999.00620.x>

479 Cruz-Ramírez, A., López-Bucio, J., Ramírez-Pimentel, G., Zurita-Silva, A., Sánchez-
 480 Calderon, L., Ramírez-Chávez, E., González-Ortega, E., Herrera-Estrella, L. 2004.
 481 The *xipoti* mutant of *Arabidopsis* reveals a critical role for phospholipid metabolism
 482 in root system development and epidermal cell integrity. *Plant Cell.* 8:2020-34.
 483 <https://doi.org/10.1105/tpc.103.018648>

484 Dos Santos Ferreira, N., Hayashi Sant' Anna, F., Massena Reis, V., Ambrosini, A., Gazolla
 485 Volpiano, C., Rothballer, M., Schwab, S., Baura, V.A., Balsanelli, E., Pedrosa, F.O.,
 486 Pereira Passaglia, L.M., Maltempi de Souza, E., Hartmann, A., Cassán, F., Zilli, J.E.
 487 2020. Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type
 488 strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 70:6203-6212.
 489 <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004517>

490 Elmore, J.M. and Coaker, G. 2011. The role of the plasma membrane H⁺-ATPase in plant-
 491 microbe interactions. *Mol. Plant* 4: 416-427. <https://doi.org/10.1093/mp/ssq083>

492 Evseeva, N.V., Matora, L.Y., Burygin, GL., Dmitrienko, V.V., Schchyogoley, S.Y. 2011.
 493 Effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharide on the functional activity
 494 of wheat root meristematic cells. *Plant Soil* 346:181-188.
 495 <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0808-9>

496 Evseeva, N.V., Tkachenko, O.V., Burygin, G.L. et al. 2018. Effect of bacterial
 497 lipopolysaccharides on morphogenetic activity in wheat somatic calluses. *World J*
 498 *Microbiol Biotechnol* 34, 3. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2386-3>
 499 Fang, Y., Vilella-Bach, M., Bachmann, R., Flanigan, A., Chen, J. 2001. Phosphatidic Acid-
 500 Mediated Mitogenic Activation of mTOR signaling. *Science*. 294:1942-1945.
 501 <https://doi.org/10.1126/science.1066015>
 502 Fenton, T.R., and Gout I, T. 2011. Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6
 503 kinases. *Int J Biochem Cell Biol.* 1:47-59.
 504 <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.09.018>
 505 Foster, D.A. 2013. Phosphatidic acid and lipid-sensing by mTOR. *Trends Endocrinol Metab*
 506 24: 272-278. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.02.003>
 507 Frias, M.A, Hatipoglu, A, Foster, D.A. 2023. Regulation of mTOR by phosphatidic acid.
 508 *Trends Endocrinol Metab*. 3:170-180. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2023.01.004>
 509 Hay, N., and Sonenberg, N. 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*. 18,
 510 1926-1945. <https://doi.org/10.1101/gad.1212704>
 511 Hemmerich, P., von Mikecz, A., Neumann, F., Sözeri, O., Wollt-Vorbeck, G., Ziehelein, R.,
 512 Krawinkel, U. 1993. Structural and functional properties of ribosomal protein L7 from
 513 humans and rodents. *Nucleic Acids Res.* 21:223-231.
 514 <https://doi.org/10.1093/nar/21.2.223>
 515 Hong, Y., Pan, X., Welti, R., Wang, X. 2008. Phospholipase Dα3 is involved in the
 516 hyperosmotic response in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 3:803-16.
 517 <https://doi.org/10.1105/lpc.107.056390>
 518 Kolesnikov, Y., Kretynin S., Bukhonska, Y., Pokotylo, I., Ruelland, E., Martinez, J., Kravets,
 519 V. 2022. Phosphatidic Acid in Plant Hormonal Signaling: From Target Proteins to

520 Membrane Conformations. Int J Mol Sci. Mar
 521 17;23(6):3227. <https://doi.org/10.3390/ijms23063227>

522 Li M., Hong Y., Wang X. 2009. Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling
 523 in plants. Biochim. Biophys. Acta. 1791: 927-935.
 524 <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.02.017>

525 Lindstrom, M. S. 2009. Emerging functions of ribosomal proteins in gene-specific
 526 transcription and translation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 379, 167–170.
 527 <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.12.083>

528 Mahfouz, M. M., Kim, S. Delauney, A.J., Verma D.P. 2006. *Arabidopsis* TARGET OF
 529 RAPAMYCIN Interacts with RAPTOR, Which Regulates the Activity of S6 Kinase
 530 in Response to Osmotic Stress Signals, The Plant Cell. 2: 477-
 531 490, <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035931>

532 Malamy, J.E., Benfey, P.N., 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of
 533 *Arabidopsis thaliana*. Development 124, 33–44. doi: 10.1242/dev.124.1.33

534 Menand, B., Desnos, T., Nussaume, L., Berger, F., Bouchez, D., Meyer, C., Robaglia,
 535 C.2002. Expression and disruption of the *Arabidopsis* TOR (target of rapamycin)
 536 gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 6422–6427.
 537 <https://doi.org/10.1073/pnas.092141899>

538 Méndez-Gómez, M., Castro-Mercado, E., Peña-Urbe, C.A., Reyes-De la Cruz, H., López-
 539 Bucio J., García-Pineda E. 2020. *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharides
 540 induce target of rapamycin signaling and growth in *Arabidopsis thaliana*. J Plant
 541 Physiol. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153270>

542 Molinaro, A., Newman M.A., Lanzetta, R., Parrilli, M. 2009. The Structures of
 543 Lipopolysaccharides from Plant-Associated Gram-Negative Bacteria. *Eur. J. Org.*
 544 *Chem.* 2009: 5887-5896. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200900682>
 545 Motes, C.M., Pechter, P., Yoo, C.M., Wang, Y.S., Chapman, K.D., Blancaflor, E.B. 2005.
 546 Differential effects of two phospholipase D inhibitors, 1-butanol and N-
 547 acylethanolamine, on in vivo cytoskeletal organization and *Arabidopsis* seedling
 548 growth. *Protoplasma*.226:109-123. <https://doi.org/10.1007/s00709-005-0124-4>
 549 Munnik T. 2001. Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends Plant*
 550 *Sci.* 5:227-33. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(01\)01918-5](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(01)01918-5)
 551 Potocký, M., Eliás, M., Profotová, B., Novotná, Z., Valentová, O., and Zárský, V. 2003.
 552 Phosphatidic acid produced by phospholipase D is required for tobacco pollen tube
 553 growth. *Planta* 217:122-130. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0965-4>
 554 Renukadevi, K.P., Angayarkanni, J., Karunakaran, G. 2012. Extraction and characterization
 555 of lipopolysaccharide from *Serratia rubidaea* and its cytotoxicity on lung cancer cell
 556 line-NCI-H69. *Acta Tech Corviniensis* 2:97–101. ISSN 2067-3809.
 557 Revenkova, E., Masson, J., Koncz, C., Afsar, K., Jakovleva, L., and Paszkowski, J. 1999.
 558 Involvement of *Arabidopsis thaliana* ribosomal protein S27 in mRNA degradation
 559 triggered by genotoxic stress. *EMBO J.* 18, 490–
 560 499. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.2.490>
 561 Rodriguez Camargo, D.C., Link, M. N., Dames, A. S. 2012. The FKBP–rapamycin binding
 562 domain of human TOR undergoes strong conformational changes in the presence of
 563 membrane mimetics with and without the regulator phosphatidic acid. *Biochemistry*
 564 51. 4909-4921. <https://doi.org/10.1021/bi3002133>

565 Rossi, C., Cazzola, H., Holden, N.H., Rossez, Y. 2020. Bacterial adherence to plant and
 566 animal surfaces via adhesin-lipid interactions. In Health Consequences of Microbial
 567 Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids (Goldfine, H., ed.), pp. 145-164,
 568 Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72473-7_13-1
 569 Ruvinsky, I and Meyuhas, O. 2006. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein
 570 synthesis to cell size. Trends Biochem Sci. 31, 324-348.
 571 <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.04.003>
 572 Schepetilnikov, M., Kobayashi, K., Geldreich, A., Caranta, C., Robaglia, C., Keller, M.,
 573 Ryabova, L.A. 2011. Viral factor TAV recruits TOR/S6K1 signalling to activate
 574 reinitiation after long ORF translation. EMBO J. 30: 1343-1356.
 575 <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.39>
 576 Tanaka, T., Kassai A., Ohmoto, M., Morito, K., Kashiwada, Y., Takaishi Y., Urikura, M.,
 577 Morishige, J., Satouchi, K and Tokumura, A. 2012. Quantification of phosphatidic
 578 Acid in Foodstuffs Using a Thin- Layer -Chromatography-Imaging Technique. J.
 579 Agric. Food. Chem. 60:4156-4161. <https://doi.org/10.1021/jf300147y>
 580 Takáč, T., Novák, D. and Šamaj, J. 2019. Recent Advances in the Cellular and
 581 Developmental Biology of Phospholipases in Plants. Front. Plant Sci. 10:
 582 362. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00362>
 583 Tkachenko, O.V., Burygin, G.L., Evseeva, N.V., Fedoneko, Y.P., Matora, L.Y., Lobacheb
 584 Y.V., Shchyogolev, S.Y. 2021. Morphogenesis of wheat calluses treated
 585 with *Azospirillum* lipopolysaccharides. Plant Cell Tiss Organ Cult. 147:147-155.
 586 <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02114-2>

587 van Dam, N.M. and Bouwmeester, H.J. 2016 Metabolomics in the rhizosphere: Tapping into
 588 belowground chemical communication. Trends Plant Sci. 21: 256-265.
 589 <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.008>
 590 Venturi, V. and Keel, C. 2016. Signaling in the rhizosphere. Trends Plant Sci. 21:187-198.
 591 <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.005>
 592 Verbon, E.H. and Liberman, L.M. 2016. Beneficial microbes affect endogenous mechanisms
 593 controlling root development. Trends Plant Sci. 21:218-229.
 594 <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.013>
 595 Veverka, V., Crabbe, T., Bird, I., Lennie, G., Muskett, F., Taylor, R., Carr, M. 2008.
 596 Structural characterization of the interaction of mTOR with phosphatidic acid and a
 597 novel class of inhibitor: compelling evidence for a central role of the FRB domain in
 598 small molecule-mediated regulation of mTOR. Oncogene. 27(5):585-95.
 599 <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210693>
 600 Warner, J. R., and McIntosh, K. B. 2009. How common are extraribosomal functions of
 601 ribosomal proteins? Mol. Cell 34, 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.03.006>
 602 Welti R., Li W., Li H., Sang Y., Biesiada H., Zhou H., Rajashekar C. B., Williams T. D and
 603 Wang X. 2002. Profiling membrane lipids in Plant Stress Responses. J. biol. Chem.
 604 277: 31994-32002. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205375200>
 605 Witte, S., Krawinkel, U., 1997. Specific interactions of the autoantigen L7 with multi-zinc
 606 finger protein ZNF7, ribosomal protein S7. J. Biol. Chem. 272, 22243–22247.
 607 <https://doi.org/10.1074/jbc.272.35.22243>
 608 Yun-Kyoung, K., Sunghan, K., Yun-jeong, S., Yoon-Sun, H., Woo-Young, K., Myung-sok,
 609 L., Choong-III, C and Desh Pal S. V. 2014. Ribosomal Protein S6, a Target of
 610 Rapamycin, is involved in the regulation of rRNA genes by possible epigenetic

611 changes in *Arabidopsis*. JBC. 289 (7): 3901-3912.
 612 <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.515015>
 613 Zhang, C., Wendel, A.A., Keogh, M. R., Harris, T. E., Chen, J. and Coleman, R. A. 2012.
 614 Glycerolipid signals alter mTOR complex 2 (mTORC2) to diminish insulin signaling.
 615 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109, 1667-
 616 1672. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110730109>
 617 Zien, C. A., C. Wang., X. Wang, and R. Welti. 2001. In vitro substrates and the contribution
 618 of the common phospholipase D, PLD α to wound-induced metabolism of lipids
 619 in *Arabidopsis*. Biochim. Biophys. Acta. 1530: 236-
 620 248. [https://doi.org/10.1016/s1388-1981\(01\)00091-9](https://doi.org/10.1016/s1388-1981(01)00091-9)
 621
 622
 623

624 **Figure legends**

625

626 **Figure 1. Effect of LPS on the growth of *A. thaliana*.** (A, B) Evaluation of the number of
627 lateral roots and length of root hairs in *A. thaliana* plants with different concentrations of
628 LPS. (C) Comparative images of the effect of LPS on first true leaf size and leaf area
629 quantification by image J. Bar = 1 mm. Values represent mean $\pm$ SE of three independent
630 experiments. Letters in the bars indicate significant difference (ANOVA, Tukey's HSD test;
631 $P < 0.05$).

632

633 **Figure 2. Effect of LPS on PLD activity.** (A) PLD activity at short periods of exposure to
634 LPS. (B) PLD activity analyzed in shoot and root of seedlings of 7 days of growth and treated
635 with 100 $\mu\text{g/mL}$ LPS for 30 minutes. (C) PA level in seedlings treated with LPS at different
636 short periods. PA 18:1⁴⁹ was used as a standard. (D) PA production in shoot and root of
637 seedlings of 7 days of growth and treated with 100 $\mu\text{g/mL}$ LPS for 30 minutes. The graphs
638 show the relative quantification measured by image J. Values represent mean $\pm$ SE of three
639 independent experiments. Letters in the bars indicate significant difference (ANOVA,
640 Tukey's HSD test; $P < 0.05$).

641

642 **Figure 3. Effect of phosphatidylcholine biosynthesis in the *Arabidopsis* growth**
643 **stimulated by LPS.** (A) Representative images of WT and *xipol1* seedlings 7 days after LPS
644 (100 $\mu\text{g/mL}$) and PA (200 μM) treatments. (B, C) Total length and number of lateral roots.
645 (D) Representative images of the root morphology of WT and *xpi1* seedlings. Bar = 1mm.
646 (E) PA production in seedlings treated with LPS for 7 days. The graph shows the relative
647 quantification measured by image J. Values represent mean $\pm$ SE of three independent

648 experiments. Letters in the bars indicate significant difference (ANOVA, Tukey's HSD test;
649 $P < 0.05$).

650

651 **Figure 4. Effect of LPS and PLD inhibition on TOR expression.** (A, B, C) Growth
652 parameters and cell viability evaluated on seedlings treated with different concentrations of
653 1-BtOH for 7 days. (D) Expression of TOR in the root meristem of seedlings grown for 7
654 days with LPS and 1-BtOH. Bar = 100 μm . The relative quantification of TOR marker
655 expression was measured by image J. (E) PA production of seedlings treated for 7 days with
656 LPS and 1-BtOH. Data are mean $\pm$ SE of three independent experiments. Letters in the bars
657 indicate significant difference (ANOVA, Tukey's HSD test; $P < 0.05$).

658

659 **Figure 5. Effect of different PA species on TOR expression.** (A) Expression of TOR in
660 the foliage and root meristems of 7 days old seedlings treated with 100 μM of different PA
661 species (16:0, 18:0 and 18:1^{Δ9}) for 120 minutes. Bar = 200 μm for foliage and 100 μm for
662 root. (B, C) Relative quantification TOR marker expression by image J. Letters in the bars
663 indicate significant difference (ANOVA, Tukey's HSD test; $P < 0.05$). D) *In silico* analysis
664 for TOR protein PA-binding site in *Arabidopsis* and other species. *Homo sapiens*,
665 *Arabidopsis thaliana*, *Camelia sativa*, *Brassica rapa*, *Raphanus sativus*, *Theobroma cacao*,
666 *Gossypium raimondii*, *Pistacia vera*, *Ricinus communis*, *Hibiscus trionum*.

667

668 **Figure 6. Effect of LPS on S6K and ribosomal protein gene expression.** (A)
669 Representative images of WT and 35S::S6K seedlings 7 days after LPS treatment (100
670 $\mu\text{g/mL}$). (B, C) Total length and total fresh weight. (D) Transcript levels of ribosomal protein
671 genes, *RPS27B* (Small ribosomal protein 27B), *RPL7B* (Large ribosomal protein L7B) and

672 *RPS6B* (Small ribosomal protein S6B) in *A. thaliana* 7 days after LPS. Values represent mean
673 $\pm$ SE of three independent experiments. Letters and asterisks in the bars indicate significant
674 difference between treatments (ANOVA, Tukey's HSD test; $P < 0.05$).

675

676 **Figure 7. Effect of LPS and PA on cell division in roots meristem.** (A) Cyclin expression
677 through the reporter marker *CycB1;1::GUS* after LPS or different PA species treatments. (B)
678 Quantification of the number of dividing cells in the root meristem. Values represent mean
679 $\pm$ SE of three independent experiments. Letters in the bars indicate significant difference
680 (ANOVA, Tukey's HSD test; $P < 0.05$).

681

682 **Figure 8. Proposed model of the mechanistic effect of *A. baldaniorum* Sp245 LPS on the**
683 **TOR signaling pathway in *A. thaliana*, mediated by PLD.** LPS, lipopolysaccharides; PM,
684 plasma membrane; PLD, phospholipase D; XPL1, *xipotl*; PC, phosphatidylcholine, PA:
685 phosphatidic acid, TOR, Target of rapamycin; S6K, ribosomal protein S6 kinase; *RPS27B*,
686 small ribosomal protein 27B, *RPL7B*, large ribosomal protein L7B.

687

688 **Supplementary figure 1. Effect of 1-BtOH on cell viability and growth of *A. thaliana***
689 **with other alcohols.** (A) Representative images of leaf blade and root tip (Nomarski optics
690 40x) of *A. thaliana* with different concentrations of 1-BtOH and stained with Evans Blue to
691 detect cell death in the tissue. Bar = 100 μ m. (B-G) Total length and total fresh weight of *A.*
692 *thaliana* seedlings after 7 days of growth with different concentrations of 1-BtOH, EtOH or
693 2-propanol (iPrOH). Values represent mean $\pm$ SE of three independent experiments. Letters
694 in the bars indicate significant difference (ANOVA, Tukey's HSD test; $P < 0.05$).

695

696 **Supplementary figure 2. Effect of phosphatidic acid on TOR expression in both**
697 **meristems. (A)** TOR marker expression in root meristem after different concentrations and
698 species of PA. **(B)** Relative quantification of the marker by image J. Barr = 100 μ m. **(C)** TOR
699 marker expression in the foliage of 7 days old seedlings treated with 100 μ M of different PA
700 species (16:0, 18:0 and 18:1 Δ^9) for 30,60 and 120 minutes. **(D)** Relative quantification of the
701 marker by image J. Bar = 200 μ m. Letters in the bars indicate significant difference
702 (ANOVA, Tukey's HSD test; P<0.05).

703

704

705

706

707

708

Figure 1

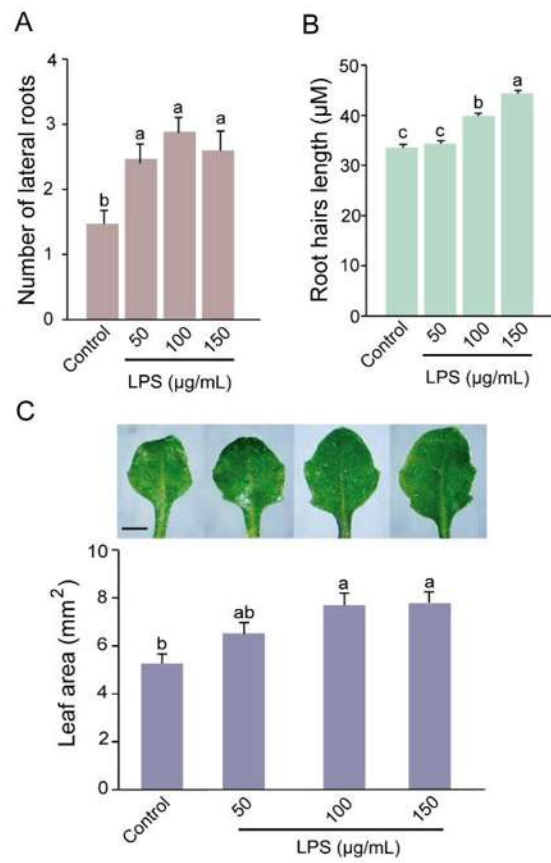


Figure 2

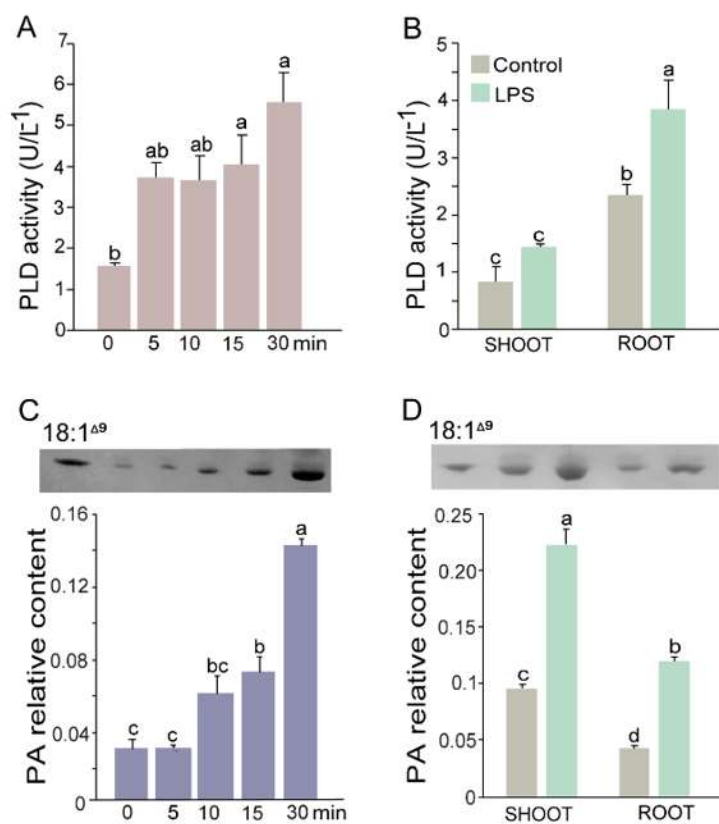


Figure 3

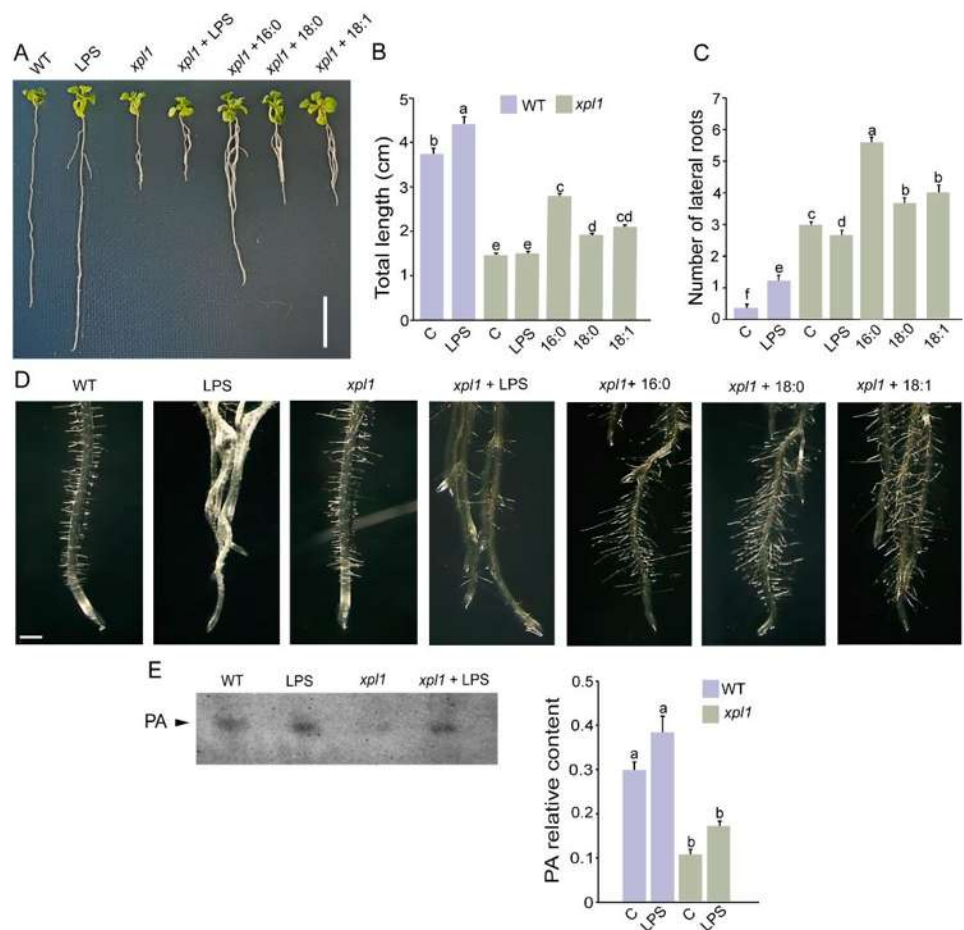


Figure 4

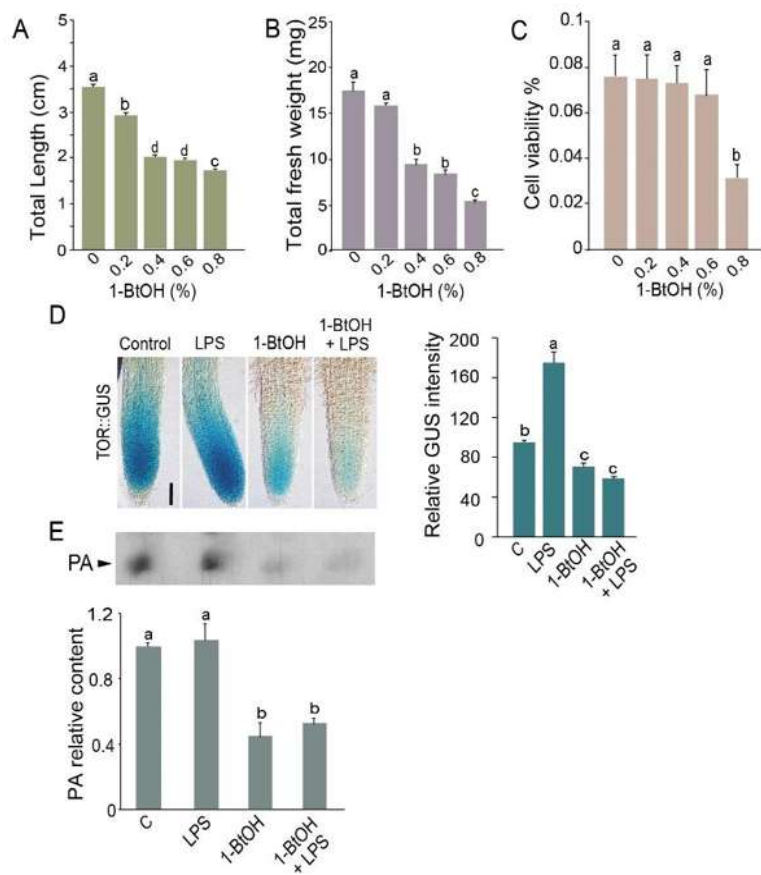


Figure 5

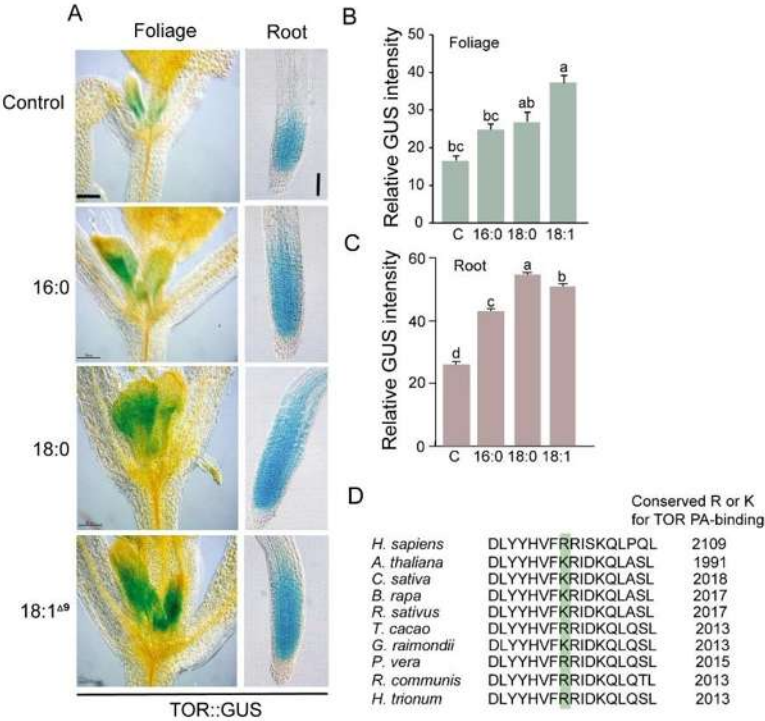


Figure 6

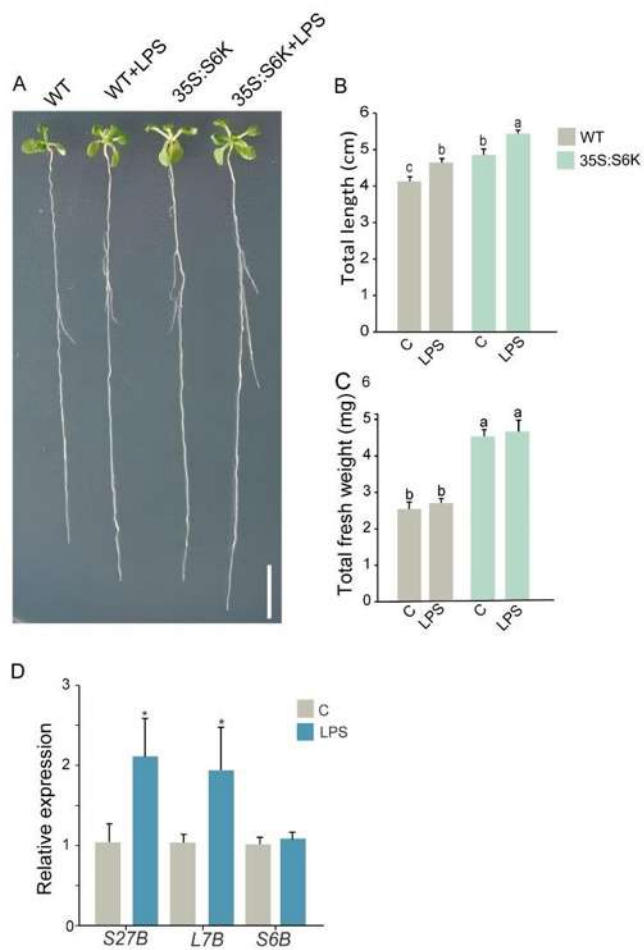


Figure 7

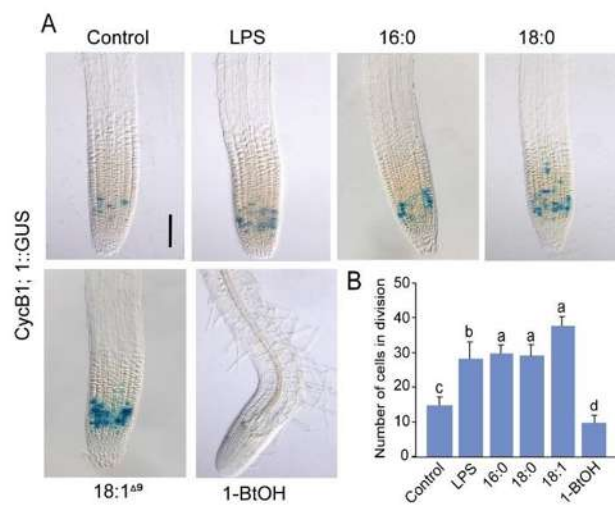
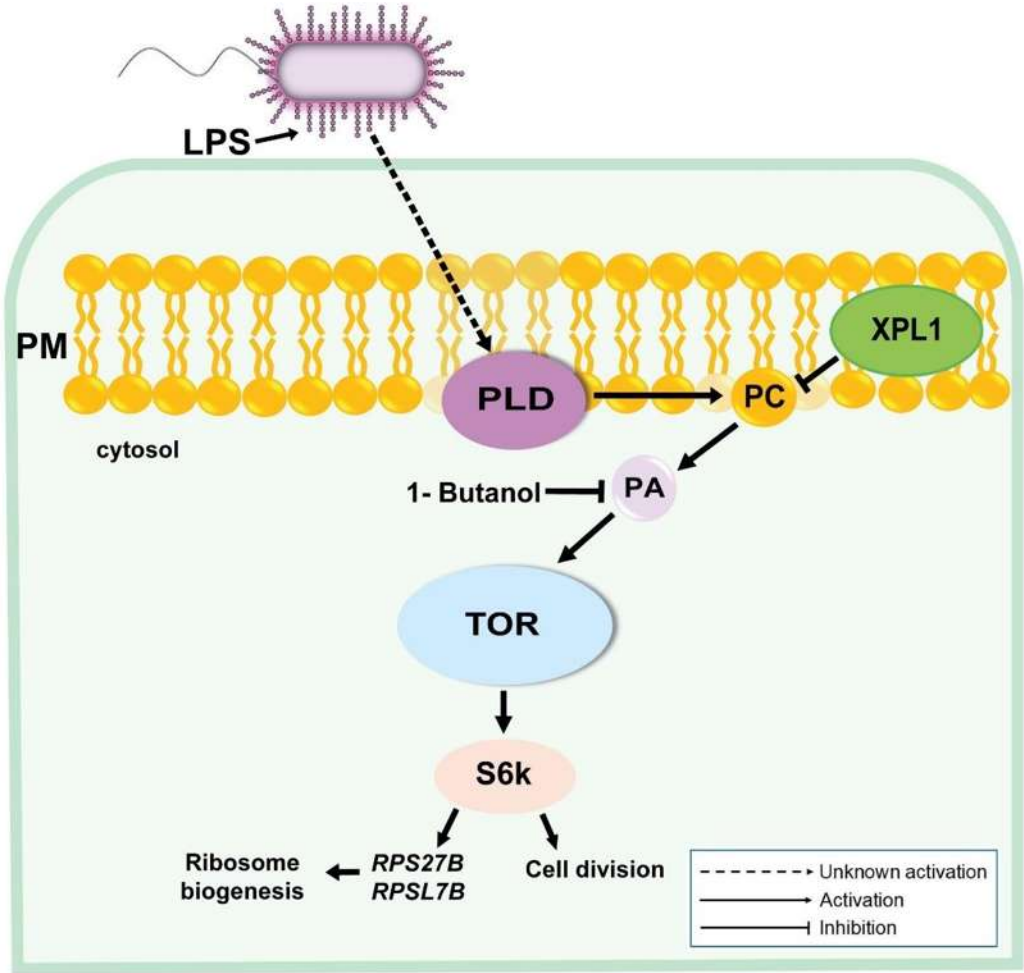
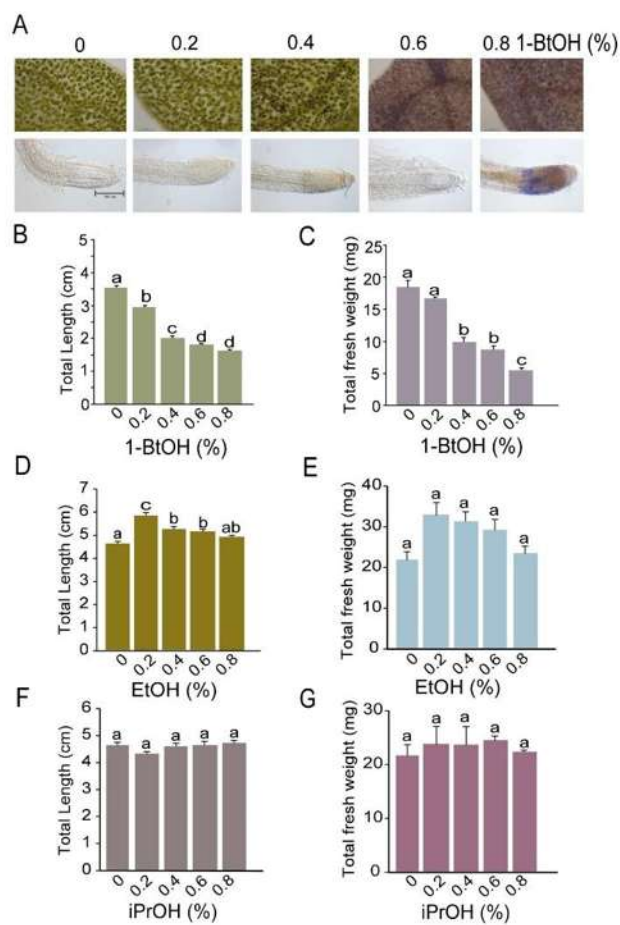
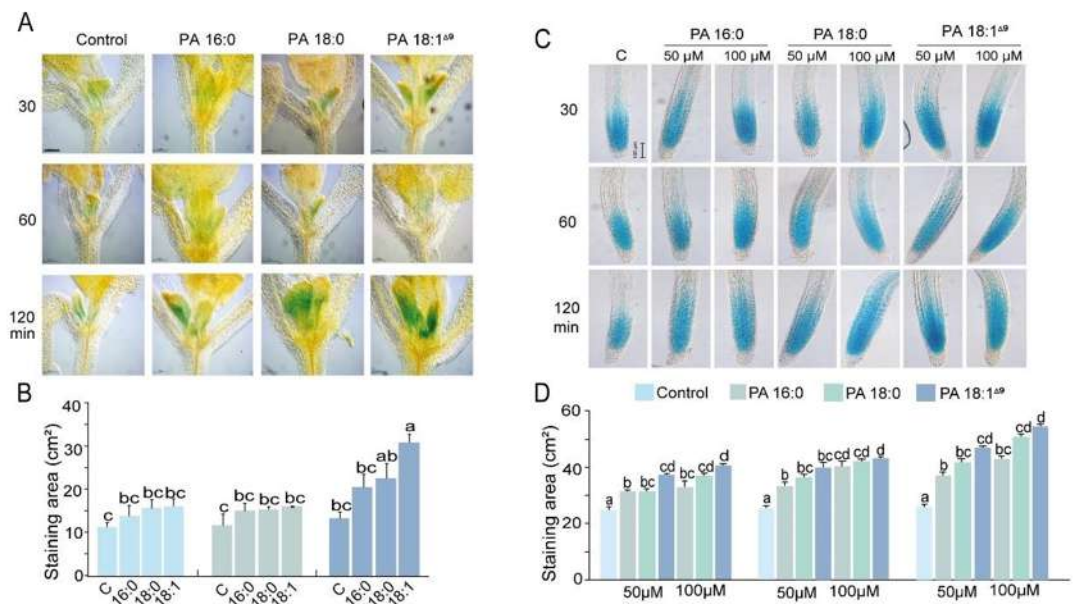


Figure 8





Supplementary figure 2



7.2. CAPÍTULO 2. Hydrogen peroxide modulates the expression of the target of rapamycin (TOR) and cell division in *Arabidopsis thaliana*.

Protoplasma
<https://doi.org/10.1007/s00709-024-01959-6>

ORIGINAL ARTICLE



Hydrogen peroxide modulates the expression of the target of rapamycin (TOR) and cell division in *Arabidopsis thaliana*

Alma Alejandra Hernández-Esquivel¹ · Jorge Alejandro Torres-Olmos¹ · Manuel Méndez-Gómez² · Elda Castro-Mercado¹ · Idolina Flores-Cortéz¹ · César Arturo Peña-Urbe¹ · Jesús Campos-García¹ · José López-Bucio¹ · Homero Reyes-de la Cruz¹ · Eduardo Valencia-Cantero¹ · Ernesto García-Pineda¹

Received: 14 February 2024 / Accepted: 15 May 2024
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2024

Abstract

Hydrogen peroxide (H_2O_2) is naturally produced by plant cells during normal development and serves as a messenger that regulates cell metabolism. Despite its importance, the relationship between hydrogen peroxide and the target of rapamycin (TOR) pathway, as well as its impact on cell division, has been poorly analyzed. In this study, we explore the interaction of H_2O_2 with TOR, a serine/threonine protein kinase that plays a central role in controlling cell growth, size, and metabolism in *Arabidopsis thaliana*. By applying two concentrations of H_2O_2 exogenously (0.5 and 1 mM), we could correlate developmental traits, such as primary root growth, lateral root formation, and fresh weight, with the expression of the cell cycle gene *CYCB1;1*, as well as TOR expression. When assessing the expression of the ribosome biogenesis-related gene *RPS27B*, an increase of 94.34% was noted following exposure to 1 mM H_2O_2 treatment. This increase was suppressed by the TOR inhibitor torin 2. The elimination of H_2O_2 accumulation with ascorbic acid (AA) resulted in decreased cell division as well as TOR expression. The potential molecular mechanisms associated with the effects of H_2O_2 on the cell cycle and TOR expression in roots are discussed in the context of the results.

Keywords Target of rapamycin · *Arabidopsis* · Hydrogen peroxide · Cell cycle · Plant growth

Introduction

In the development of every living organism, essential steps involve cell division and growth, processes intricately linked to anabolic and catabolic metabolism (Leavers and McNeill 2005; Goranov and Amon 2010; Johnson and Lenhard 2011). In plants, cell proliferation and expansion are closely tied to nutrient availability. Unlike animals, postembryonic growth in plants is indeterminate, sustained by shoot and root meristems, zones marked by accelerated mitosis that

facilitates cell replenishment for constructing the entire plant body. Cell proliferation requires the integration of physiological and metabolic processes, ultimately reconfiguring phenotypical and adaptive behaviors (Goranov and Amon 2010; De Virgilio and Loewith; Considine and Foyer 2021).

Reactive oxygen species (ROS) play crucial roles as signaling molecules in normal plant metabolism, participating in the appropriate biochemical responses of plant cells to abiotic stresses (Gapper and Dolan 2006; Jaspers and Kangasjärvi 2010; Mittler et al. 2011; Wrzaczek et al. 2013). ROS are distributed along the root and are vital for its normal growth (Tsukagoshi et al. 2010; Ivanchenko et al. 2013).

The ROS hydrogen peroxide (H_2O_2) is primarily detected in the differentiation zone and in root hairs (Dunand et al. 2007). In plant cells' normal metabolism, H_2O_2 is consistently produced at basal levels through protein complexes during photosynthesis and respiration. These levels escalate in response to environmental stress (Desikan et al. 2004). Additional sources of H_2O_2 include enzymes like NADPH oxidase, cell wall peroxidases, amine oxidases, and flavin-containing enzymes (Neill et al. 2002). With lower reactivity

Handling Editor: Etienne Herzog

✉ Ernesto García-Pineda
egpineda@umich.mx

¹ Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, Edif. B1, Morelia, Michoacán CP 58040, México

² Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN), Unidad Irapuato, 36821 Irapuato, Gto., México

Published online: 28 May 2024

Springer

compared to other ROS, H_2O_2 exhibits a relatively long half-life and low toxicity and its membrane permeability allows rapid migration into adjacent cells or tissues, inducing a myriad of biological responses (Gechev et al. 2006; Mittler et al. 2004).

Biochemical and genetic studies support the role of H_2O_2 as a signaling molecule in plants, participating in various morphological, physiological, and biochemical processes (Mittler et al. 2004). For instance, Tsukagoshi et al. (2010) demonstrated that reduced levels of H_2O_2 lead to meristem enlargement and increased cell elongation, contributing to enhanced root growth. In contrast, high H_2O_2 concentrations significantly reduced the meristem length (Su et al. 2016). H_2O_2 strongly activates mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and cell cycle genes during the emergence of adventitious and lateral roots (Pan et al. 2012). The activation of genes expressing proteins associated with plant signaling and expansion, cell elasticity and contraction, and cell cycle monitoring is also linked to H_2O_2 (Barba-Espin et al. 2010). However, the relationship between H_2O_2 and the TOR pathway, as well as its involvement in cell division in the main root, has been weakly studied.

The Target of Rapamycin (TOR) is a Ser/Thr protein kinase within the phosphoinositide 3-kinase-related kinase family (Wulfschleger et al. 2006). TOR signaling serves as a pivotal regulator of growth and development, influencing protein synthesis, ribosome biogenesis, metabolism, and autophagy in response to growth factors, nutrient availability, and energy status (Wulfschleger et al. 2006; Laplante and Sabatini 2012; Maegawa et al. 2015). Two TOR complexes, TORC1 and TORC2, have been identified in both yeast and animals. TORC1 is highly conserved in yeast, animals, and plants. It senses various signals such as growth factors, amino acids, energy status, and oxygen to modulate cell growth, as well as other metabolic processes (Wulfschleger et al. 2006; Laplante and Sabatini 2012; Hara et al. 2002; Kim et al. 2002; Loewith et al. 2002; Martin et al. 2004). In plants, the TOR kinase serves as a checkpoint that links nutrient status to the regulation of root system development and other functions associated with growth. TOR senses and transduces glucose signals to activate root meristems by orchestrating global transcriptional reprogramming (Xiong et al. 2013; Xiong and Sheen 2014). In *Arabidopsis*, the repression of TOR transcription by RNA interference (RNAi) or the chemical inhibition with rapamycin strongly inhibits postembryonic development and organ growth in seedlings, respectively. This inhibition includes cotyledon expansion, leaf development, petiole elongation, and primary and lateral root growth (Ren et al. 2012; Caldana et al. 2013; Rexin et al. 2015). The ribosomal protein S6 kinase (S6K), a Ser/Thr AGC kinase, functions as a downstream element in TORC1 signaling, contributing to cell growth, proliferation, and stress response by regulating protein

synthesis and ribosomal biogenesis (Xiong and Sheen 2014; Schepetilnikov et al. 2013).

Ribosomal proteins are crucial for mRNA recognition and decoding, tRNA recognition, subunit assembly, transport, and stabilization (Klein et al. 2004). The S27 protein is a ribosomal protein with reminiscent features of transcription factors (Wool 1993). *Arabidopsis* harbors three isoforms of S27: ARS27A, ARS27B, and ARS27C, encoded by three closely related genes. In proximity to the zinc finger motif, each isoform exhibits a distinct amino acid. The removal of RPS27B impacts the biogenesis of 40S ribosomal subunits, leading to a slow-growing, with compromised prerRNA processing (Revenkova et al. 1999).

Several studies suggest a potential connection between the H_2O_2 and TOR pathway in modulating growth under stress conditions. In *Arabidopsis*, the mutation in the *mafl* gene has been linked to heightened sensitivity to both H_2O_2 and TOR inhibitors such as AZD8055 and Torin-1. Maf1 is a conserved repressor of RNA polymerase III (Pol III) across eukaryotes and plays a crucial role in the synthesis of small RNAs, 5S rRNA, and tRNAs essential for protein translation and cell growth. It is a phosphoprotein and its dephosphorylation activates its repressor activity (Ahn et al. 2019).

In mammalian cells, stress-induced ROS can suppress TORC1 signaling and activate autophagy mechanisms (Pant et al. 2017). Unlike other eukaryotes, our understanding of the role of TOR in plants is limited, and it remains unclear whether H_2O_2 affects plant growth by modifying TOR kinase activity. In this context, it has been demonstrated in *Arabidopsis* that certain abiotic stresses, including salt, osmotic, cold, and oxidative stress, can regulate TOR transcripts (Pereyra et al. 2020). The current study aims to investigate the impact of H_2O_2 on TOR expression and cell division in *A. thaliana* seedlings.

Materials and methods

Biological material and *Arabidopsis* growth

Wild-type *Arabidopsis thaliana* (Columbia ecotype) and transgenic *Arabidopsis* lines, including CYCB1;1::GUS and TOR::GUS (TOR/tor-1; Wassilewskaja ecotype), were utilized in this study. The *tor-1* allele, a generous gift from Dr. Benoît Menand (Aix Marseille Université, Marseille, France), carries a translational fusion between the TOR N-terminal sequence and GUS. The chimeric reporter protein cyclin-GUS was used to examine the mitotic activity (G2/M) in root meristem. This chimeric reporter was formed by fusing a genomic fragment containing putative promoter sequences and the coding sequence corresponding to the N-terminal 116 amino acids of *Arabidopsis* CycB1;1

(p48^{CycB1::l}), along with a candidate mitotic destruction box (MDB), to *Escherichia coli uidA* (Colón-Carmona et al. 1999).

For *Arabidopsis* germination, seeds were surface-sterilized with 95% ethanol for 5 min, followed by 20% bleach (Cloralex) for 5 min, and then washed five times with sterilized distilled water. Subsequently, the seeds were stored at 4 °C for 2–4 days before germination and growth on agar plates containing 0.2X Murashige and Skoog (MS) medium [0.9 g/L MS salt, 0.6% sucrose (w/v), and 10 g/L Agar Plant TC (PhytoTechnology Laboratories, St. Lenexa, KS, USA)], with a pH of 7. The plates were positioned vertically in a plant growth chamber (Percival Scientific AR-95L) at 22 °C, with a photoperiod of 16 h of light and 8 h of darkness, and a light intensity of 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. All reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA).

H₂O₂, ascorbic acid (AA) and indole-3-acetic acid (IAA) treatments

Four days after germination, plants were transferred to agar plates containing varying H₂O₂ concentrations (0.5 and 1 mM) (Claeys et al., 2014). A stabilized hydrogen peroxide solution (30% w/w in dd H₂O) was diluted with dd H₂O to achieve the specified concentrations. The diluted solution was then added to warm agar, homogenized, and distributed in Petri plates for solidification. Ascorbic acid (AA) was externally applied at a concentration of 1 mM, following the protocol by Li et al. (2018).

3,3-diaminobenzidine (DAB) plant tissue stain

H₂O₂ in situ detection was achieved following a modified procedure from Thordal-Christensen et al. (1997). Plant tissue was immersed in 1 mg/mL DAB, pH 3.8, and incubated for 15 min. The tissue was then cleared in 95% ethanol for 1 h and mounted in 50% glycerol. Images of the roots, captured with a digital camera on a microscope, were processed using AmScope software.

H₂O₂ levels were determined following the method outlined by Junglee et al. (2014). In brief, plant tissue (30 mg) was homogenized with 1 mL of a solution containing 0.25 mL trichloroacetic acid (TCA) (0.1% w/v), 0.5 mL KI (1 M), and 0.25 mL potassium phosphate buffer (10 mM, pH 8.0) at 4 °C for 10 min. The samples were protected from light, and a control was prepared with H₂O instead of KI to account for tissue coloration background. The homogenate was then centrifuged at 12,000 $\times g$ for 15 min at 4 °C. The supernatant was recovered and left to incubate at room temperature (20–22 °C) for 20 min. Subsequently, 100 μL of the samples were analyzed in a spectrometer at 350 nm.

Quantification was performed using a calibration curve generated with H₂O₂ standard solutions prepared in 0.1% TCA.

Cis-elements TOR promoter analysis

The Eukaryotic Promoter Database (EPD; <https://epd.expasy.org/epd>) (Meylan et al. 2020) was used to identify and restrict the TOR (AT1G50030.1) promoter extension to -624 bp upstream from ATG. The Plant Promoter Analysis Navigator (PlantPAN 4.0) (<http://plantpan.ips.ncnu.edu.tw/plantpan4>) (Chow et al. 2019) was used to identify putative cis-regulatory elements and predict transcription factors that may bind to the conserved sequence motifs in the promoter of TOR.

Analysis of plant growth parameters

Plant growth parameters were assessed six days after transplantation. The fresh weight per plant was determined using an analytical scale (Ohaus V14130 Voyager). Primary root growth was measured with a ruler. The number of lateral roots was determined using a stereoscopic microscope (Leica MZ6) on the primary root. Lateral root density (LRD) was calculated by dividing the number of lateral roots by the length of the primary root and is expressed as lateral root number per centimeter. Cell division was analyzed using the cell cycle marker CYCB1;1::GUS.

Histochemical analysis

Transgenic lines TOR::GUS and CYCB1;1::GUS were stained according to Malamy and Benfey (1997). Relative expression levels were quantified from the resulting photographs using ImageJ software (<https://image.nih.gov/ij/>) following the method described by Béziat et al. (2017).

RPS27B gene expression analysis by RT-qPCR

Total RNA was extracted from frozen plant samples subjected to a 24-h treatment with 1 mM H₂O₂ or Torin2 at 25 μM (Montané and Menand 2013; Li et al. 2017b). The concentration and quality of RNA were assessed by measuring absorbance (with an absorbance ratio of 260 nm/280 nm targeted between 1.6 and 2.0) using a spectrophotometer. Subsequently, RT-qPCR was conducted in triplicate for each treatment and gene, employing the ABI StepOne™ System thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The RT-qPCR analysis utilized SYBR-Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) in a reaction volume comprising 5 μL SYBR-Green PCR Master Mix, 1 μL of the oligonucleotide mixture (forward and reverse), 2 μL of cDNA, and 3 μL of deionized sterile water. Gene-specific primers RPS27B-F (TTAGCTTCTTGCGAAGATGGTTCTTCAA)

and RPS27B-R (AGAATTGTCTGGCAGTTTCCGCAC ACCA) from the study by Kim et al. (2014) were employed. The thermal cycling protocol comprised an initial denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s and annealing/extension at 60 °C for 30 s. To confirm the amplification of a single, specific target cDNA, a dissociation curve analysis was conducted following the manufacturer's recommendations (Applied Biosystems). For the dissociation curve, the reaction was halted at 95 °C for 15 s, followed by immediate annealing and extension at 60 °C for 1 min, with a subsequent temperature increase to 95 °C at a rate of 0.3 °C per second. The RT-qPCR data for each target gene were presented as average expression levels over three biological replicates, each with two technical replicates per reaction. The Actin gene served as the reference gene for normalization across samples. Finally, gene expression was assessed using the comparative $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (66).

Statistical analysis

All experiments were conducted a minimum of three times, and the results were consistently comparable. Data analysis was performed using STATISTICA program version 8.0.550. Univariate and multivariate analyses, followed by a post-hoc test (Tukey's HSD), were employed to assess differences between treatments.

Results

Hydrogen peroxide inhibits *Arabidopsis* primary root growth and promotes lateral root development

The effects of different H_2O_2 concentrations (0.5 and 1 mM) on *Arabidopsis* growth were examined. Six days after treatment, morphological analysis of the plants did not reveal deleterious or growth repression symptoms in the shoot system (data not shown). In contrast, a marked inhibition of growth, approximately 50% of the main root axis, was observed at both used H_2O_2 concentrations (Fig. 1a). Concomitantly, treatments showed approximately a 150% and 225% increase in lateral root density (Fig. 1b), and about a 48.5% increase in lateral root number at the same concentrations compared to untreated control plants (Fig. 1c). Accordingly, the root and shoot fresh weights did not change relative to the untreated control (Fig. 1d, e).

Expression of TOR in response to H_2O_2

To analyze the effect of H_2O_2 on the expression of TOR reporter, 6-day-old *Arabidopsis* seedlings were treated with 0.5 or 1 mM H_2O_2 for 24 h. Subsequently, reporter

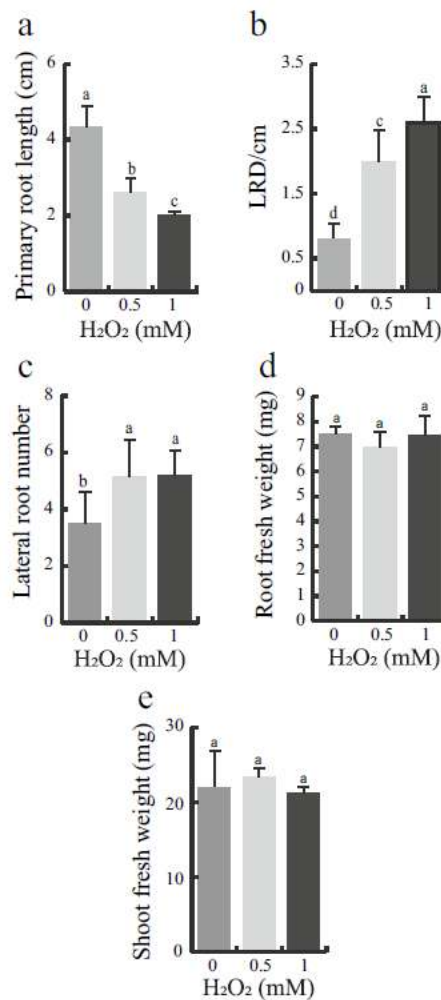


Fig. 1 Effect of various H_2O_2 concentrations on *Arabidopsis* growth. Plant growth parameters were analyzed six days after transplantation. **a–c** Quantification of root growth parameters. **d, e** Quantification of fresh weight. $n=10$. The letters on the bars indicate statistically significant differences, as determined by Tukey's HSD test ($P < 0.05$)

expression was analyzed in the root and shoot meristems. TOR expression in the root meristem exhibited concentration-dependent increases of 44% and 52% for 0.5 and 1 mM H_2O_2 , respectively, relative to the untreated control. A

similar response in TOR expression was observed in the apical meristem, where the expression progressively increased with H₂O₂ treatments (Fig. 2c, d).

To gain information about the transcriptional regulation of the TOR gene by H₂O₂, an *in silico* analysis of 624 bp of the TOR promoter was performed using the PlantPAN database to search for transcription factor binding sites (TFBS) in the TOR promoter and their corresponding transcription factor (TF) families responsive to H₂O₂. Four putative sequences corresponding to the MYB, WRKY, NAC, and AP2 TFs family were identified in the promoter. All consensus sequences for TFs in the TOR promoter were highly conserved (Supplementary Fig. 1; Supplementary Table 1). This analysis suggests that direct regulation of TOR gene expression could be possible through transcription factors activated by H₂O₂.

One of the outcomes of TOR pathway stimulation is the activation of ribosome biogenesis. Consequently, we directed our attention to examining the impact of H₂O₂ on ribosome biogenesis by quantifying the expression of the *RPS27B* gene. This gene encodes the ribosomal 40S subunit protein S27B, which plays a crucial role in ribosomal small subunit assembly. The assessment was conducted after a 24-h treatment with 1 mM H₂O₂. Following H₂O₂ treatment, the expression of the *RPS27B* gene increased by 94.34% compared to the untreated control. To establish a connection between *RPS27B* expression and TOR pathway, we utilized the TOR activity inhibitor, Torin2, at a concentration of 25 μ M. In the presence of H₂O₂, the inhibitor reduced the expression of *RPS27B* by 64%, providing support for the probability that H₂O₂ activates the whole TOR pathway, including ribosome biogenesis (Fig. 2e). Based on these findings, it can be inferred that H₂O₂ activates both TOR expression and activity.

Ascorbic acid decrease H₂O₂, TOR expression, and cell division

Next, the effect of the biological H₂O₂ levels on TOR expression was analyzed using ascorbic acid (AA) at 1 mM to decrease its accumulation in the root tip. AA decreased the H₂O₂ level by approximately 30% 30 min after treatment and further decreased at 120 min after treatment (Fig. 3a, b). When TOR expression was analyzed, its expression pattern matched that observed for H₂O₂ accumulation, exhibiting a progressive decrease over time, ranging from approximately 30% at 30 min to approximately 55% at 120 min after AA treatment (Fig. 4a, b).

Furthermore, H₂O₂ had an impact on cyclin expression in the root meristem. Exogenous treatment of the root meristem with 1 mM H₂O₂ at various time points resulted in a noticeable increase in its expression with prolonged treatment. However, this expression declined following

AA treatment and exhibited time-dependent characteristics (Fig. 5a, b). Quantifying cells expressing cyclin, the percentage increased from approximately 7% to about 82% after 30 to 120 min of H₂O₂ treatment, while it decreased from 42 to 28% with AA treatment during the same time-frame (Fig. 5c).

In addition, after cultivating plants for 6 days in the presence of AA, a notable decrease of approximately 50% in total length was observed. This decline could be attributed to the impact of AA on both TOR expression and cell division processes (Fig. 5d).

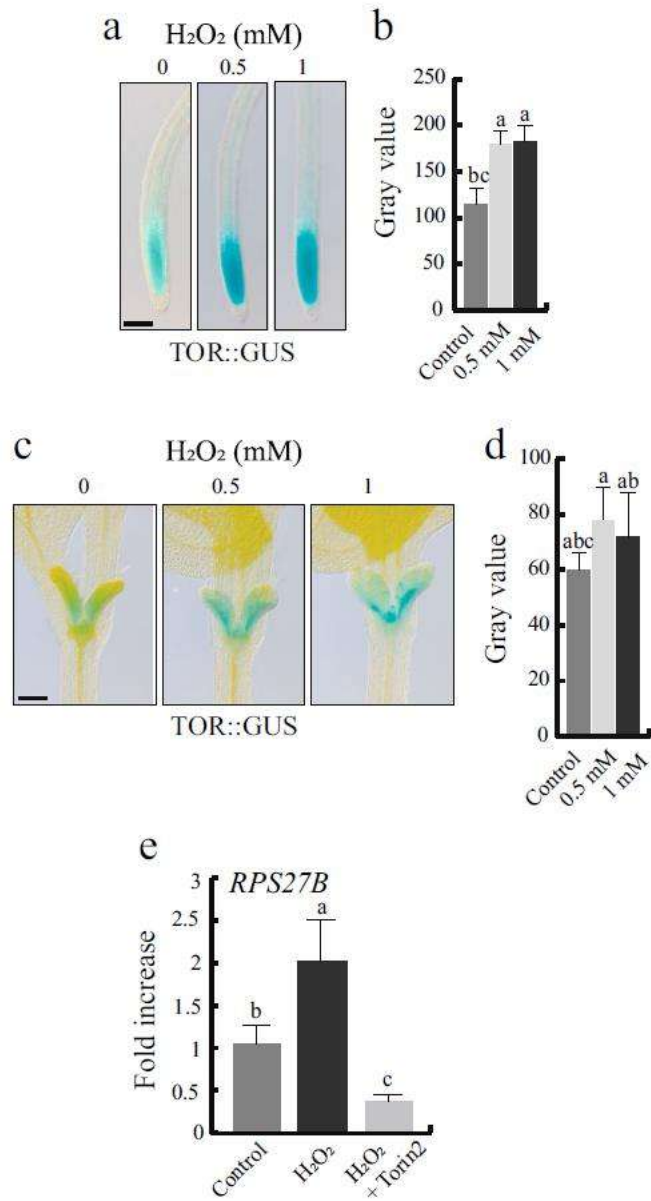
Discussion

While the influence of redox balance on root architecture and plant growth has been documented (Passaia et al. 2014; Attacha et al. 2017), limited knowledge exists on how H₂O₂ specifically affects metabolic pathways controlling cell growth and development in plants. This study explored whether H₂O₂ had an impact on the TOR pathway and cell division, particularly in the root meristem.

The application of H₂O₂ induced morphological changes in *Arabidopsis*, including a reduction in primary root length and an augmentation in the formation and density of lateral roots. These effects imply that ROS play a role in the regulation of plant growth and development. It is acknowledged that the primary root of *Arabidopsis* undergoes continuous processes of cell division and expansion, alongside the development of lateral roots and root hairs. Maintaining ROS homeostasis is crucial for controlling these root growth events, as alterations in ROS balance can restrict growth, induce lateral root emergence, and enhance root hair growth (Foreman et al. 2003; Orman-Ligeza et al. 2016). The configuration of root architecture seems to result, in part, from the interplay of ROS and auxin signaling (Du and Scheres 2018). Additionally, other biochemical pathways, including the TOR pathway—a central regulator of growth and development (Wullschlegel et al. 2006), could be implicated. Consequently, this study explored deeply into the relationship between H₂O₂, TOR signaling, and cell division in the root meristem of *Arabidopsis*.

In an initial experiment aimed at analyzing the impact of varying H₂O₂ concentrations on TOR expression, the results revealed a concentration-dependent expression pattern in the root meristem. Similar effects were observed in the apical meristem. Thus, H₂O₂ exerted a molecular-level influence on TOR activation; however, whether this effect was direct or indirect on TOR remains unknown. As an approach to understand whether H₂O₂ might directly stimulate TOR expression, we conducted an *in silico* analysis of the TOR promoter to identify elements responsive to H₂O₂. Four highly conserved consensus sequences to the TFs MYB, WRKY, NAC,

Fig. 2 TOR expression and *RPS27B* gene quantification in response to H_2O_2 . TOR expression and activity were analyzed in 60-day-old *Arabidopsis* seedlings after 24 h of exposure to different H_2O_2 concentrations. **a–d** TOR expression in the root and in the shoot and relative quantification of GUS intensity using Image J. Bar = 1 cm. $n = 20$. **e** *RPS27B* expression analysis by RT-qPCR after H_2O_2 at 1 μ M or Torin2 at 25 μ M treatment. $n = 9$. The letters on the bars indicate statistically significant differences, as determined by Tukey's HSD test ($P < 0.05$)



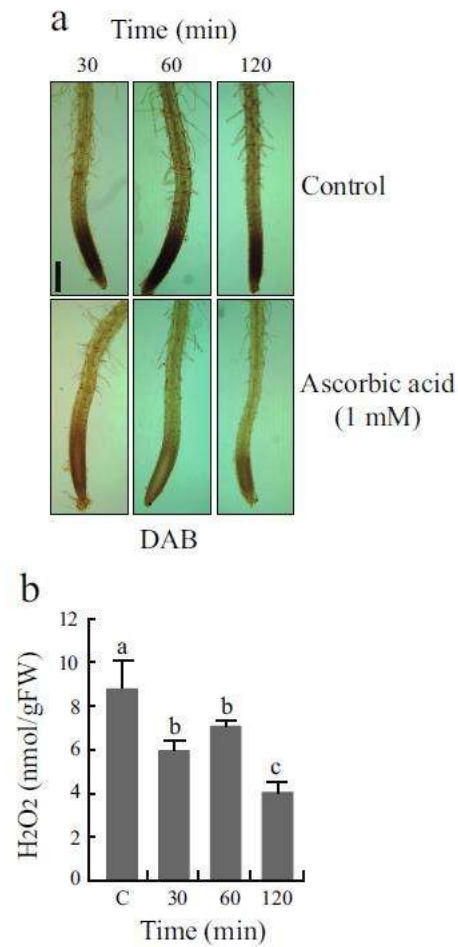


Fig. 3 Ascorbic acid (AA) decreases H₂O₂ production in the root tip. AA was exogenously added at 1 mM at different times, and H₂O₂ location and quantification were analyzed. **a** DAB stain. **b** H₂O₂ quantification. $n=10$. The letters on the bars indicate statistically significant differences, as determined by Tukey's HSD test ($P<0.05$)

and AP2 were identified. The notable conservation of these motifs suggests their potential role as *cis*-elements involved in the transcriptional regulation of the TOR gene by H₂O₂. While the biological function of these motifs has not been confirmed, they represent an interesting target for further study to advance our understanding of TOR regulation by

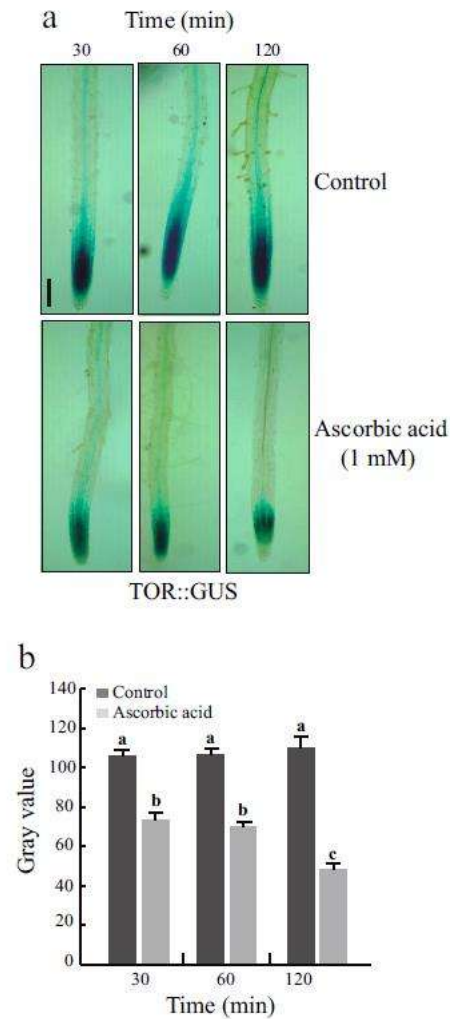


Fig. 4 Effect of AA on TOR expression. Six-day-old seedlings were treated with AA at different times. TOR expression in root meristem (**a**) and relative quantification of GUS intensity using Image J (**b**). $n=10$. The letters on the bars indicate statistically significant differences, as determined by Tukey's HSD test ($P<0.05$)

ROS. In fact, studies have demonstrated a significant upregulation of transcription factors MYB and WRKY in response to 10 mM H₂O₂ during adventitious rooting in mung beans

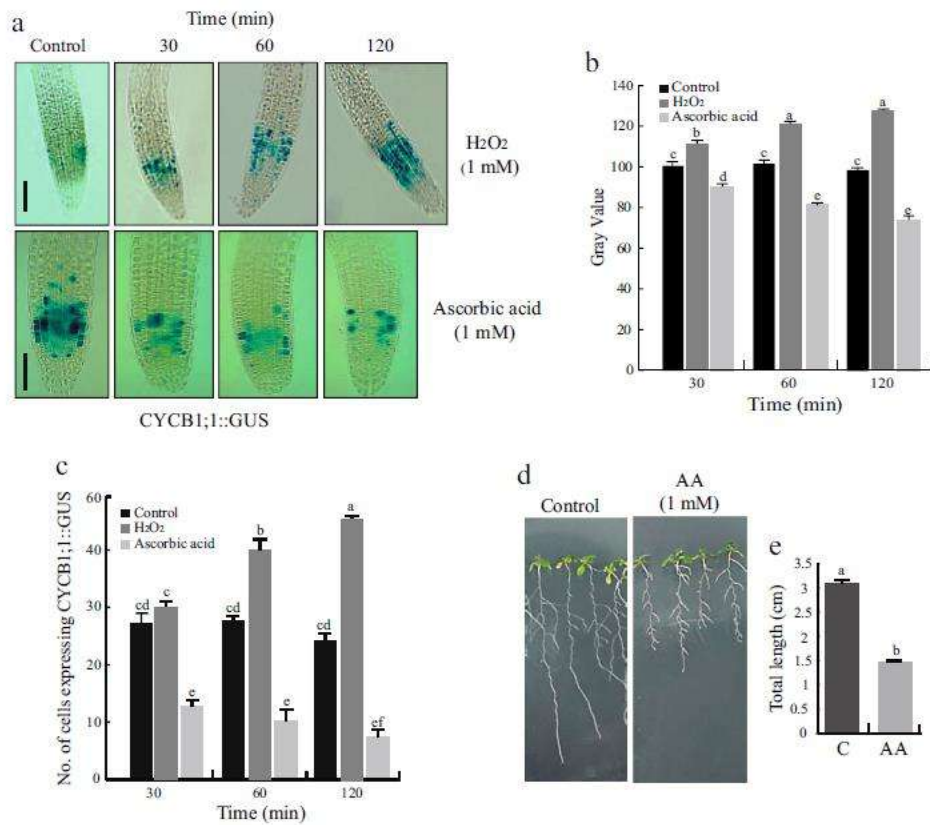


Fig. 5 Effect of H₂O₂ and AA on cyclin expression in the root meristem. **a**, **b** Cyclin expression and relative quantification of GUS intensity using Image J. **c** Number of cells expressing CYCB1;1::GUS. **d**,

e Effect of AA on total plant growth. $n=10$. The letters on the bars indicate statistically significant differences, as determined by Tukey's HSD test ($P < 0.05$)

[*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek] (Li et al. 2017a, b). MYB transcription factors are ubiquitously distributed in plants and participate in various plant-specific processes, including the cell cycle, root development, and differentiation (Ambawat, 2013). On the other hand, WRKY transcription factors are implicated in diverse stress responses, underscoring their crucial role in oxidative stress. Several WRKY genes (WRKY30, -75, -48, -39, -6, -22, -53, -8) exhibit upregulation in response to H₂O₂ treatments, conferring stress tolerance to plants (Zhou et al. 2011). Specifically, the ROS-inducible *Arabidopsis* WRKY15 transcription factor gene modulates plant growth and responses to salt/osmotic stress. Overexpression of WRKY15 results in an increased

leaf area and a 15–25% boost in plant biomass (Bakshi and Oelmüller, 2014). Additionally, NAC and AP2 transcription factors play pivotal roles in plant growth, development, and resistance to various biotic and abiotic stresses (Li et al. 2017a, b). The impact of these transcription factors on plant growth and development, along with the presence of conserved motifs for these proteins in the TOR promoter, suggests that the regulation of TOR expression by H₂O₂ may be mediated by these transcription factors. Experimental evidence in tomato (*Solanum lycopersicum*) confirms the existence of *cis*-elements within the TOR promoter that play a role in modulating plant growth and development. Specifically, *cis*-elements for the MYC2 transcription factor were

identified within this promoter, indicating their involvement in regulatory mechanisms. MYC2 serves as a key regulator in the Jasmonic Acid signaling pathway and is involved in a variety of plant growth and stress resistance processes (Zhang et al. 2015; Breeze 2019; Li et al. 2021). MYC2 promoted the accumulation of *SITOR* transcription (Zhang et al. 2022). This study confirms the presence of important *cis*-elements implicated in plant growth and development within the TOR promoter. Additionally, it demonstrates the regulation of this promoter by plant hormones. Exploring whether MYC2 can mediate the impact of H₂O₂ on plant growth on the TOR promoter presents an intriguing possibility for research. The absence of *cis*-elements for the MYC2 transcription factor in our in silico analysis may be attributed to the limited coverage of the examined promoter extension, which only spans -624 bp. MYC was identified within the range of -686 to -826 bp in the tomato TOR promoter (Zhang et al. 2022).

The upregulation of the *RPS27B* gene, associated with ribosome biogenesis, upon exposure to H₂O₂ suggests the activation of the entire TOR pathway by this ROS. This relationship was supported by treatment with the TOR inhibitor Torin2, which effectively suppressed the expression of *RPS27B* induced by H₂O₂. Torin2 is a second-generation ATP-competitive inhibitor known for its potency and selectivity for mTOR. Although Torin2 also exhibits significant activity against phosphatidylinositol-3 kinase-like kinase (PIKK) family kinases such as ATM, ATR, and DNA-PK, it demonstrates notable selectivity ranging from 100 to 800-fold over these kinases (Liu et al. 2013). Thus, the downregulation of *RPS27B* gene expression by Torin2 could mainly result from the inhibition of TOR activity.

Besides the possibility of a direct regulation of TOR by H₂O₂, another plausible scenario involves the redox regulation of the TOR protein mediated by H₂O₂. Considering its physicochemical attributes, H₂O₂ can serve as a messenger, conveying a redox signal to a protein target (Sies 2017). In this context, TOR could be subject to redox regulation at the FATC domain. In its oxidized state, this domain exhibits a distinctive structural motif—an α -helix and a COOH-terminal disulfide-bonded loop between two conserved cysteine residues. The reduction of the disulfide bond significantly enhances flexibility within the COOH-terminal loop region, potentially increasing the accessibility of various hydrophobic side chains in this area. Consequently, the reduction may modify the binding behavior of FATC to other portions of TOR or other cellular partners (Dames et al. 2005). Moreover, additional TOR regulators are prone to redox regulation, including the TSC complex (tumor suppressor protein containing a GTPase-activating protein), influencing TOR activity. It has been reported that cysteine oxidants activate mTORC1 by inducing Rheb activation. It is plausible that the TSC complex serves as a significant target for cysteine

oxidation to activate mTORC1. Indeed, mammalian TSC1 and TSC2 have 12 and 31 cysteine residues, respectively (Yoshida et al. 2011). In plants, there is much information to uncover regarding the potential redox regulation of TOR signaling.

We utilized ascorbic acid (AA) as an antioxidant to reduce H₂O₂ levels and analyzed its impact on TOR expression and cell division. A correlation was observed between the decrease in H₂O₂ accumulation, TOR expression, and cell division, suggesting their coordination as events associated to H₂O₂ effect. In this context, the regulation of the cyclin CYCB1;1 by the TOR pathway has been previously reported in *Arabidopsis* (Barrada et al. 2019). In addition, cell cycle regulatory genes were influenced by H₂O₂ in both alfalfa and *Arabidopsis*, impacting root architecture. Thus, when H₂O₂ was eliminated using the NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium (DPI), the genes *MsCDKB1;1*, *MsCDKB2;1*, *AtCDKB1;1*, and *AtCDKB2;1*, responsible for lateral root formation, were not induced (Chen et al. 2018). These findings support the correlation observed in our study between H₂O₂, TOR, and cell division.

The impact of H₂O₂ on the cell cycle has been more extensively studied in mammalian cells, where it activates p70S6k (Bae et al. 1999). This protein plays a crucial role in facilitating the progression of cells from the G0/G1 to the S phase by translational upregulation of mRNAs encoding components of protein synthesis. This activation is responsive to specific inhibitors of the p70S6k signaling pathway, namely rapamycin and wortmannin. This sensitivity reveals that ROS acts upstream of phosphatidylinositol 3-kinase, a key regulator in various cellular processes such as cell survival, proliferation, and differentiation (Bae et al. 1999; Liu et al. 2009).

Root length reduction was noted in response to both H₂O₂ and AA, albeit with differing impacts on TOR and cyclin expression. However, a comprehensive analysis of this observation was not undertaken. Further experiments, including assessments of cell size and number, and meristem size, are necessary to elucidate potential explanations for these observations. While the association of H₂O₂ with the TOR pathway has been documented previously, the connection between AA and TOR remains largely unexplored. Both molecules likely influence plant growth regulation by other molecular pathways, in addition to the TOR pathway. In addition to its effect on the TOR pathway, the decrease in root length by AA could be attributed to the biochemical effects of exogenously added AA. It is possible that at higher AA concentrations and in the presence of transition metals such as copper and iron, which could be present in the medium or within the cell, catalytic processes could lead to the production of hydroxyl radicals, causing toxicity (Clément et al. 2001) and a subsequent decrease in plant growth.

In plants, the molecular mechanisms through which ROS modulate TOR signaling remain elusive. This study presents novel insights into this subject, laying the groundwork for future investigations to elucidate in detail how ROS and TOR collectively regulate cell growth in plants.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00709-024-01959-6>.

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

Declarations

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

References

- Ahn CS, Lee DH, Pai HS (2019) Characterization of Maf1 in *Arabidopsis*: function under stress conditions and regulation by the TOR signaling pathway. *Planta* 249:527–542. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-3024-5>
- Ambawat S, Sharma P, Yadav NR, Yadav RC (2013) MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. *Physiol Mol Biol Plants* 19:307–321. <https://doi.org/10.1007/s12298-013-0179-1>
- Attacha S, Solbach D, Bela K, Moseler A, Wagner S, Schwarzländer M, Aller I, Müller SJ, Meyer AJ (2017) Glutathione peroxidase-like enzymes cover five distinct cell compartments and membrane surfaces in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* 40:1281–1295. <https://doi.org/10.1111/pce.12919>
- Bae GU, Seo DW, Kwon HK, Lee HY, Hong S, Lee ZW, Ha KS, Lee HW, Han JW (1999) Hydrogen peroxide activates p70(S6k) signaling pathway. *J Biol Chem* 274:32596–32602. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.46.32596>
- Bakshi M, Oelmüller R (2014) WRKY transcription factors: Jack of many trades in plants. *Plant Signal Behav* 9:e27700. <https://doi.org/10.4161/psb.27700>
- Barba-Espin G, Diaz-Vivancos P, Clemente-Moreno MJ, Albacete A, Faize L, Faize M (2010) Interaction between hydrogen peroxide and plant hormones during germination and the early growth of pea seedlings. *Plant Cell Environ* 33:981e994. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02120.x>
- Barrada A, Djendli M, Desnos T, Mercier R, Robaglia C, Marie-Hélène Montané M-H, Menand B (2019) A TOR-YAK1 signaling axis controls cell cycle, meristem activity and plant growth in *Arabidopsis*. *Development* 146:dev171298. <https://doi.org/10.1242/dev.171298>
- Béziat C, Barbez E, Feraru MI, Lucyshyn D, Kleine-Vehn J (2017) Light triggers PILS dependent reduction in nuclear auxin signaling for growth transition. *Natural Plants* 3:17105. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.105>
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Breeze E (2019) Master MYCs: MYC2, the jasmonate signaling “master switch.” *Plant Cell* 31:9–10. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00004>
- Caldana C, Li Y, Leisse A, Zhang Y, Bartholomaeus L, Fernie AR, Willmitzer L, Giavalisco P (2013) Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants reveal a general metabolic switch controlling growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 73:897–909. <https://doi.org/10.1111/tpj.12080>
- Chen Z, Gu Q, Yu X, Huang L, Xu S, Wang R, Shen W, Shen W (2018) Hydrogen peroxide acts downstream of melatonin to induce lateral root formation. *Ann Bot* 121:1127–1136. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx207>
- Chow C-N, Lee T-Y, Hung Y-C, Li G-Z, Tseng K-C, Liu Y-H, Kuo P-L, Zheng H-Q, Chang W-C (2019) PlantPAN3.0: a new and updated resource for reconstructing transcriptional regulatory networks from ChIP-seq experiments in plants. *Nucleic Acids Res* 47:D1155–D1163
- Clément MV, Ramalingam J, Long LH, Halliwell B (2001) The *in vitro* cytotoxicity of ascorbate depends on the culture medium used to perform the assay and involves hydrogen peroxide. *Antioxid Red Signal* 3:157–163. <https://doi.org/10.1089/152308601750100687>
- Colón-Carmona A, You R, Haimovitch-Gal T, Doerner P (1999) Technical advance: spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J* 20:503–508. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113.1999.00620.x>
- Considine JM, Foyer HC (2021) Oxygen and reactive oxygen species-dependent regulation of plant growth and development. *Plant Physiol* 186:79–92. <https://doi.org/10.1093/plphys/kia077>
- Corradetti MN, Inoki K, Bardeesy N, DePinho RA, Guan KL (2004) Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. *Genes Develop* 18:1533–1538. <https://doi.org/10.1101/gad.1199104>
- Dames SA, Mulet JM, Rathgeb-Szabo K, Hall MN, Grzesiek S (2005) The solution structure of the FATC domain of the protein kinase target of rapamycin suggests a role for redox-dependent structural and cellular stability. *J Biol Chem* 280:20558–20564. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501116200>
- De Virgilio C, Loewith R (2006) Cell growth control: little eukaryotes make big contributions. *Oncogene* 25:6392–6415. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209884>
- Desikan R, Hancock JT, Neill SJ (2004) Oxidative stress signalling. In: Hirt H, Shinozaki K (eds) *Plant responses to abiotic stress*. Topics in Current Genetics, vol 4. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-39402-0_6
- Du Y, Scheres B (2018) Lateral root formation and the multiple roles of auxin. *J Exp Bot* 69:155–167. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx223>
- 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>
- Fan Y, Zhang Y, Rui C, Xu N, Zhang H, Wang J, Malik Waqar A, Han M, Zhao L, Lu X, Chan X, Chen C, Ye W (2021) Zinc finger transcription factor ZAT family genes confer multi-tolerances in *Gossypium hirsutum* L. *J Cotton Res* 4:24. <https://doi.org/10.1186/s42397-021-00098-0>
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JDG, Davies JM, Dolan L (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422:442–446. <https://doi.org/10.1038/nature01485>
- Gapper C, Dolan L (2006) Control of plant development by reactive oxygen species. *Plant Physiol* 141:341–345. <https://doi.org/10.1104/pp.106.079079>
- Gechev TS, Van Breusegem F, Stone JM, Denerv I, Laloi C (2006) Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays* 28:1091–1101. <https://doi.org/10.1002/bies.20493>

- Goranov AI, Amon A (2010) Growth and division – not a one-way road. *Curr Opin Cell Biol* 22:795–800. <https://doi.org/10.1016/j.ccb.2010.06.004>
- Gwinn DM, Shackelford DB, Egan F, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 30:214–226. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.03.003>
- Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K (2002) Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110:177–189. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00833-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00833-4)
- Inoki K, Zhu T, Guan KL (2003) TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115:577–590. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00929-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00929-2)
- Ivanchenko MG, den Os D, Monshausen GB, Dubrovsky JG, Bednaro A, Krishnan N (2013) Auxin increases the hydrogen peroxide (H₂O₂) concentration in tomato (*Solanum lycopersicum*) root tips while inhibiting root growth. *Ann Bot* 112:1107–1116. <https://doi.org/10.1093/aob/mct181>
- Jaspers KJ (2010) Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiol Plant* 138:405–413. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01321.x>
- Johnson K, Lenhard M (2011) Genetic control of plant organ growth. *New Phytol* 191:319–333. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03737.x>
- Junglee S, Urban L, Sallanon H, Lopez-Lauri F (2014) Optimized assay for hydrogen peroxide determination in plant tissue using potassium iodide. *Am J Anal Chem* 5:730–736. <https://doi.org/10.4236/ajac.2014.511081>
- Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM (2002) mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110:163–175. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00808-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00808-5)
- Kim YK, Kim S, Shin YJ, Hur YS, Kim WY, Lee MS, Cheon CI, Verma DP (2014) Ribosomal protein S6, a target of rapamycin, is involved in the regulation of rRNA genes by possible epigenetic changes in Arabidopsis. *J Biol Chem* 289:3901–3912. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.515015>
- Klein D, Moore PB, Steitz TA (2004) The roles of ribosomal proteins in the structure, assembly and evolution of the large ribosomal subunit. *J Mol Biol* 340:141–177. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.03.076>
- Laplanche M, Sabatini DM (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149:274–293. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>
- Leevers SJ, McNeill H (2005) Controlling the size of organs and organisms. *Curr Opin Cell Biol* 17:604–609. <https://doi.org/10.1016/j.ccb.2005.09.008>
- 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* 22:1469–1476. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.05.015>
- Li SW, Leng Y, Shi RF (2017a) Transcriptomic profiling provides molecular insights into hydrogen peroxide-induced adventitious rooting in mung bean seedlings. *BMC Genom* 18:188. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3576-y>
- Li X, Cai W, Liu Y, Li H, Fu L, Liu Z, Xu L, Liu H, Xu T, Xiong Y (2017b) Differential TOR activation and cell proliferation in Arabidopsis root and shoot apices. *Proc Natl Acad Sci USA* 114:2765–2770. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618782114>
- Li X, Makavitskaya M, Samokhina V, Mackievic V, Navaselsky I, Hryvusevich P, Smolikova G, Medvedev S, Shabala S, Min YuM, Demidchik V (2018) Effects of exogenously-applied L-ascorbic acid on root expansive growth and viability of the border-like cells. *Plant Signal Behav* 13:9. <https://doi.org/10.1080/15592324.2018.1514895>
- Li Z, Min D, Fu X, Zhao X, Wang J, Zhang X, Li F, Li X (2021) The roles of SIMYC2 in regulating ascorbate-glutathione cycle mediated by methyl jasmonate in postharvest tomato fruits under cold stress. *Sci Hortic-Amsterdam* 288:110406. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110406>
- Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ (2009) Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nature reviews. Drug Discov* 8:627–644. <https://doi.org/10.1038/nrd2926>
- Liu Q, Xu C, Kirubakaran S, Zhang X, Hur W, Liu Y, Kwiatkowski NP, Wang J, Westover KD, Gao P, Ercan D, Niepel M, Thoreen CC, Kang SA, Patricelli MP, Wang Y, Tupper T, Altabel A, Kawamura H, Held KD, Chou DM, Elledge SJ, Janne PA, Wong KK, Sabatini DM, Gray NS (2013) Characterization of Torin2, an ATP-competitive inhibitor of mTOR, ATM, and ATR. *Cancer Res* 73:2574–2586. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1702>
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods* 25:402–408
- Loewith R, Jacinto E, Wulschleger S, Lörberg A, Crespo JL, Bonenfant D, Oppliger W, Jenoe P, Hall MN (2002) Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell* 10:457–468. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00636-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00636-6)
- Maegawa K, Takii R, Ushimaru T, Kozaki A (2015) Evolutionary conservation of TORC1 components, TOR, Raptor, and LST8, between rice and yeast. *Mol Gen Genom* 263:313–322. <https://doi.org/10.1007/s00438-015-1056-0>
- Malamy JE, Benfey PN (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124:33–44. <https://doi.org/10.1242/dev.124.1.33>
- Martin DE, Soullard A, Hall MN (2004) TOR regulates ribosomal protein gene expression via PKA and the forkhead transcription factor FHL1. *Cell* 119:969–979. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.047>
- Meylan P, Dreos R, Ambrosini G, Groux R, Bucher P (2020) EPD in 2020: enhanced data visualization and extension to ncRNA promoters. *Nuc Acids Res* 48:D65–D69. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1014>
- Mittler R, Vandersaunders S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9:490–498. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.047>
- Mittler R, Vandersaunders S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, Van Breusegem F (2011) ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci* 16:300–309. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.03.007>
- Montané MH, 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. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert242>
- Neill S, Desikan R, Hancock J (2002) Hydrogen peroxide signaling. *Curr Opin Plant Biol* 5:388e395. [https://doi.org/10.1016/s1369-5266\(02\)00282-0](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(02)00282-0)
- Orman-Ligeza B, Parizot B, de Rycke R, Fernandez A, Himschoot E, Van Breusegem F, Bennett MJ, Périlleux C, Beeckman T, Draye X (2016) RBOH-mediated ROS production facilitates lateral root emergence in Arabidopsis. *Development* 143:3328–3339. <https://doi.org/10.1242/dev.136465>
- Pan J, Zhang M, Kong X, Xing X, Liu Y, Zhou Y, Liu Y, Sun L, Li D (2012) ZmMPK17, a novel maize group D MAP kinase gene, is involved in multiple stress responses. *Planta* 235:661e676. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1510-0>
- Pant K, Saraya A, Venugopal SK (2017) Oxidative stress plays a key role in butyrate-mediated autophagy via Akt/mTOR pathway in

- hepatoma cells. *Chemico-Biological Interact* 273:99–106. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.06.001>
- Passaia G, Queval G, Bai J, Margis-Pinheiro M, Foyer CH (2014) The effects of redox controls mediated by glutathione peroxidases on root architecture in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 65:1403–1413. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert486>
- Pereyra CM, Aznar NR, Rodríguez MS, Salerno GL, Martínez-Noel GMA (2020) Target of rapamycin signaling is tightly and differently regulated in the plant response under distinct abiotic stresses. *Planta* 251:21. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03305-0>
- Ren M, Venglat P, Qiu S, Feng L, Cao Y, Wang E, Xiang D, Wang J, Alexander D, Chalivendra S, Logan D, Mattou A, Selvaraj G, Datla R (2012) Target of rapamycin signaling regulates metabolism, growth, and life span in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24:4850–4874. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.107144>
- Revenkova E, Masson J, Koncz C, Afsar K, Jakovleva L, Paszkowski J (1999) Involvement of *Arabidopsis thaliana* ribosomal protein S27 in mRNA degradation triggered by genotoxic stress. *EMBO J* 18:490–499. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.2.490>
- Rexin D, Meyer C, Robaglia C, Veit B (2015) TOR signalling in plants. *Biochem J* 470:1–14. <https://doi.org/10.1042/BJ20150505>
- Reyes de la Cruz H, Aguilar R, Sanchez de Jimenez E (2004) Functional characterization of a maize ribosomal S6 protein kinase (ZmS6K), a plant ortholog of metazoan p70(S6K). *Biochemistry* 43:533–539. <https://doi.org/10.1021/bi035222z>
- Schepetilnikov M, Dimitrova M, Mancera-Martínez E, Geldreich A, Keller M, Ryabova LA (2013) TOR and S6K1 promote translation reinitiation of uORF-containing mRNAs via phosphorylation of eIF3h. *EMBO J* 32:1087–1102. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.61>
- Sies H (2017) Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol* 11:613–619. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>
- Su C, Liu L, Liu H, Ferguson BJ, Zou Y, Zhao Y, Wang T, Wang Y, Xia Li X (2016) H₂O₂ regulates root system architecture by modulating the polar transport and redistribution of auxin. *J Plant Biol* 59:260–270. <https://doi.org/10.1007/s12374-016-0052-1>
- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley—powdery mildew interaction. *Plant J* 11:1187–1194. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113.1997.11061187.x>
- 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>
- Wool IG (1993) The bifunctional nature of ribosomal proteins and speculations on their origins. In: Neirhaus KH et al (eds) *The Translational Apparatus*. Plenum Press, New York, NY, pp 727–737
- Wrzaczek M, Brosche M, Kangasjärvi J (2013) ROS signaling loops—production, perception, regulation. *Curr Opin Plant Biol* 16:575–582. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.07.002>
- Wullschlegel S, Loewith R, Hall MN (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124:471–484. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.016>
- Xiong Y, Sheen J (2014) The role of target of rapamycin signaling networks in plant growth and metabolism. *Plant Physiol* 164:499–512. <https://doi.org/10.1104/pp.113.229948>
- Xiong Y, McCormack M, Li L, Hall Q, Xiang C, Sheen J (2013) Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature* 496:181–186. <https://doi.org/10.1038/nature12030>
- Yoshida S, Hong S, Suzuki T, Nada S, Mannan AM, Wang J, Okada M, Guan KL, Inoki K (2011) Redox regulates mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) activity by modulating the TSC1/TSC2-Rheb GTPase pathway. *J Biol Chem* 286:32651–32660. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.238014>
- Zhang F, Yao J, Ke J, Zhang L, Lam VQ, Xin XF, Zhou XE, Chen J, Brunzelle J, Griffin PR, Zhou M, Xu HE, Melcher K, He SY (2015) Structural basis of JAZ repression of MYC transcription factors in jasmonate signalling. *Nature* 525:269–273. <https://doi.org/10.1038/nature14661>
- Zhang Y, Xing H, Wang H, Yu L, Yang Z, Meng X, Hu P, Fan H, Yu Y, Cui N (2022) SIMYC2 interacted with the SITOR promoter and mediated JA signaling to regulate growth and fruit quality in tomato. *Front Plant Sci* 13:1013445. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1013445>
- Zhou X, Jiang Y, Yu D (2011) WRKY22 transcription factor mediates dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *Mol Cells* 31:303–313. <https://doi.org/10.1007/s10059-011-0047-1>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

7.3. CAPÍTULO3. RESULTADOS ADICIONALES

7.3.1. La inoculación con *Azospirillum baldaniorum* Sp245 promueve la acumulación de ácido ascórbico, y disminuye la expresión de la cinasa TOR y la división celular en la raíz de *Arabidopsis*

Ciencia Nicolaita 91: 136-147; Agosto de 2024

doi:10.35830/cn.vi91.805



La inoculación con *Azospirillum baldaniorum* Sp245 promueve la acumulación de ácido ascórbico, y disminuye la expresión de la cinasa TOR y la división celular en la raíz de *Arabidopsis*

Inoculation with *Azospirillum baldaniorum* Sp245 promotes ascorbic acid accumulation while decreasing the expression of TOR kinase and cell division in the *Arabidopsis* root

Alma Alejandra Hernández Esquivel¹, Jorge Alejandro Torres Olmos¹, Marisol Bernal Avilés¹, Manuel Méndez Gómez², Elda Castro Mercado¹, Cesar Arturo Peña Uribe¹, Homero Reyes de la Cruz¹, Ernesto García Pineda^{1*}

¹ Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, Edif. B1 CP 58040, Morelia, Michoacán, México

² CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato. C.P. 36821, Irapuato, Gto. México

Historial

Manuscrito recibido: 4 de junio de 2024

Manuscrito aceptado: 22 de agosto de 2024

Manuscrito publicado: agosto 2024

*Autor para correspondencia

Ernesto García Pineda

e-mail: egpineda@umich.mx

ORCID: 0000-0002-4739-7741

Resumen

El ácido ascórbico (AA) participa en procesos de elongación y división celular. En este trabajo se reporta el efecto de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 sobre la acumulación de ácido ascórbico, la proteína cinasa Target of Rapamycin (TOR) y la división celular en *Arabidopsis thaliana*. La inoculación con Sp245 incrementó la acumulación de ácido ascórbico en el follaje, mientras que su adición inhibió el crecimiento de las plantas, la expresión de TOR, y la división celular en el meristemo de la raíz. El ácido ascórbico también incrementó la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Asimismo, el H_2O_2 disminuyó la expresión de TOR y su actividad sobre su proteína blanco S6K. Se discute la relación entre AA, TOR y H_2O_2 en la bioestimulación de *Arabidopsis* por Sp245.

Palabras clave: Ácido ascórbico, target of rapamycin, peróxido de hidrógeno, bioestimulación, bacterias benéficas.

Abstract

Ascorbic acid (AA) plays a role in cell elongation and division processes. In this work, the effect of *Azospirillum baldaniorum* Sp245 on the accumulation of ascorbic acid, the protein kinase TOR (Target of Rapamycin), and cell division in *Arabidopsis thaliana* is reported. Inoculation with Sp245 increased AA accumulation in the foliage, while its addition inhibited plant growth, TOR expression, and cell division in the root meristem. AA also increased the production of hydrogen peroxide (H_2O_2). Furthermore, H_2O_2 decreased TOR expression and its activity on its target protein S6K. The relationship between AA, TOR, and H_2O_2 for bio-stimulation of *Arabidopsis* by Sp245 is discussed.

Keywords: Ascorbic acid, target of rapamycin, hydrogen peroxide, biostimulation, beneficial bacteria.

Introducción

Azospirillum baldaniorum Sp245 es una bacteria de vida libre que tiene la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y promueve el crecimiento de varias especies vegetales como el maíz, arroz, trigo y pastos, aumentando su rendimiento en condiciones de campo (Carro *et al.*, 2018). Algunas de sus propiedades específicas incluyen la producción de fitohormonas, la solubilización de fosfato y la

resistencia al estrés abiótico, que contribuyen a su eficacia como promotora del crecimiento vegetal (Carro *et al.*, 2018).

El ácido ascórbico, también conocido como vitamina C, es fundamental como antioxidante, protegiendo a las plantas del estrés oxidativo (Foyer y Noctor, 2011; Smirnoff y Wheeler, 2000). Está implicado en la regulación del desarrollo de órganos como las raíces y los brotes mediante la modulación

de la actividad de enzimas antioxidantes y la regulación de la expresión génica (Li *et al.*, 2019). También controla el ciclo celular, especialmente durante la fase de transición G1/S (Veljovic-Jovanovic *et al.*, 2002), y actúa como molécula señalizadora en la comunicación entre la planta y los microorganismos del suelo (Gullner *et al.*, 2018). Por ejemplo, Kim *et al.* (2014) encontraron que la aplicación de ácido ascórbico promueve la colonización de las raíces de *Arabidopsis thaliana* por rizobacterias promotoras del crecimiento.

El ácido ascórbico y el peróxido de hidrógeno son componentes cruciales en el metabolismo antioxidante de las plantas y están estrechamente relacionados con diversos procesos fisiológicos y de señalización. El ácido ascórbico desempeña un papel fundamental en la neutralización y eliminación de especies reactivas de oxígeno (ERO), incluyendo el peróxido de hidrógeno, que pueden causar daño oxidativo a las células vegetales (Mittler *et al.*, 2004). El peróxido de hidrógeno también puede actuar como una molécula señalizadora en la regulación de diversos procesos fisiológicos, ya que, en bajas concentraciones, se activan las respuestas adaptativas al estrés abiótico y la defensa contra patógenos. Sin embargo, en concentraciones elevadas afecta varios procesos celulares debido a que genera estrés oxidativo (Apel y Hirt, 2004). La relación entre el ácido ascórbico y el peróxido de hidrógeno en las plantas es dinámica y altamente regulada, así, los niveles de ácido ascórbico pueden influir en la producción y el metabolismo del peróxido de hidrógeno (Foyer y Noctor, 2011).

La cinasa Target of Rapamycin (TOR) es un regulador central del crecimiento y la proliferación celular en las plantas, participa en la coordinación de respuestas fisiológicas y metabólicas frente a señales ambientales y nutricionales. TOR regula la actividad de diversos factores de transcripción y proteínas cinasas implicadas en la adaptación a cambios en el ambiente, e interacciona con el peróxido de hidrógeno en el control del metabolismo celular (Crespo *et al.*, 2005). Dicha relación aún está siendo investigada, pero se plantea que la señalización entre ambos converge en la modulación del crecimiento y la tolerancia al estrés. En este

trabajo se analizó el efecto del ácido ascórbico sobre la vía metabólica de TOR y su regulación por peróxido de hidrógeno en *Arabidopsis thaliana* en respuesta a la inoculación con *Azospirillum baldaniorum* Sp245.

Materiales y métodos

Material biológico

En este estudio se emplearon las siguientes líneas de *Arabidopsis thaliana*: Col-0, CYCB1;1::GUS (Colón-Carmona *et al.*, 1999), TOR/tor::GUS (Menand *et al.*, 2002), y *tor-es* (Xiong y Sheen, 2012). La línea reportera TOR/tor::GUS fue obsequiada amablemente por el Dr. Benoît Menand de la Universidad de Aix-Marseille, Marsella, Francia. Esta línea lleva una fusión traduccional entre la secuencia N-terminal de TOR y GUS. La CYCB1;1::GUS se utilizó para examinar la actividad mitótica (G2/M) en el meristemo de la raíz, ya que consiste en la fusión de un fragmento genómico que contiene una secuencia promotora putativa y una secuencia codificante correspondiente a los 116 aminoácidos N-terminales de la CycB1;1 de *Arabidopsis* (Colón-Carmona *et al.*, 1999). Se utilizó también la cepa Sp245 de *Azospirillum baldaniorum*, donada por la Dra. Gladys Alexandre, del Departamento de Bioquímica y Biología Celular y Molecular de la Universidad de Tennessee, Knoxville, Tennessee USA. Todos los reactivos químicos fueron adquiridos de la marca Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

Preparación de inóculo de Sp245

Se partió de un volumen de 50 mL de medio mínimo LB (Luria-Bertani) (peptona, 10 g/L; extracto de levadura, 5 g/L; NaCl, 5 g/L; MgSO₄, 0.186 g/L CaCl₂, 0.2775 g/L; pH 7.0), al que se le adicionaron 150 µL de un pre-inóculo con una densidad óptica a 600 nm de 0.900. El cultivo se creció durante 16 horas. Un mL del cultivo bacteriano se centrifugó a 3,893 g durante 5 min a temperatura ambiente (Eppendorf 5415D), y se eliminó el sobrenadante, y la pastilla de bacterias se resuspendió en 1 mL de NaCl al 0.85%, se agitó en vortex y se centrifugó nuevamente a 3,893 g durante 5 min. Se eliminó

el sobrenadante, y las bacterias se resuspendieron en 1 mL de amortiguador MgSO_4 a 0.01 M, para su utilización como inóculo.

Tratamiento de *Arabidopsis* con Sp245

Las semillas de *Arabidopsis* se desinfectaron en una campana de flujo laminar (adicionando 700 μL de etanol al 96%, agitación durante 5 minutos, se desechó el líquido, 700 μL de cloro al 20%, agitación durante 5 minutos y 5 lavados con 700 μL de agua destilada estéril). Se adicionaron 100 μL de agua destilada estéril y se almacenaron a 4 °C por 48 horas.

Las semillas se germinaron en medio de Murashige y Skoog (MS) solidificado con agar y se incubaron en una cámara de crecimiento (2,000 Lux, 26 °C, y con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad), durante 3 días. Posteriormente, se aplicaron 10 μL del cultivo bacteriano formando una línea de 4 cm a una distancia de 1 cm del fondo de la caja Petri. Las plántulas germinadas se trasplantaron a las cajas Petri con la bacteria. Las cajas se sellaron con parafilm y se incubaron en una cámara de crecimiento (2,000 Lux, 26 °C, y con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad), durante 6 días.

Para los tratamientos con ácido ascórbico y peróxido de hidrógeno, las plántulas se transfirieron a cajas de Petri ajustando el medio de crecimiento con dos concentraciones de ácido ascórbico, 1 y 2 mM (Li *et al.*, 2018), y dos concentraciones de peróxido de hidrógeno, 0.5 y 1 mM (Claeys *et al.*, 2014). Al final de cada experimento, se cuantificó la longitud de la raíz primaria, el número de raíces laterales, el peso de la raíz, peso del follaje, longitud del meristemo y densidad de raíces laterales.

Cuantificación de ácido ascórbico

El tejido vegetal se trituró en 1 mL de agua destilada estéril, se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min y se empleó el sobrenadante para cuantificar el ácido ascórbico. La mezcla de ensayo consistió de: 100 μL de muestra, 800 μL de amortiguador de acetato 3 M y 100 μL de una solución de 0.3 mg/mL de 2-6 diclorofenolindifenol (DCPIP). La mezcla se agitó durante 5 segundos y se analizó la absorbancia en un espectrofotómetro a 520 nm (Davies *et al.*, 1991).

El incremento en la absorbancia es proporcional a la acumulación de ácido ascórbico.

Análisis de proteínas reporteras

La actividad de la proteína reportera GUS, presente en las líneas transgénicas CYCB1::GUS y TOR::GUS se analizó de acuerdo al protocolo reportado por Malamy y Benfey, 1997. Las muestras se montaron en portaobjetos y cubreobjetos para analizarlas bajo microscopía de campo claro.

Detección de H_2O_2 por tinción con 3,3'-diaminobencidina (DAB)

Las plántulas de 6-7 días de crecimiento se colocaron en una solución con DAB a una concentración de 1 mg/mL, pH 3.8. Las muestras se incubaron durante 2 h. El tejido se clarificó en etanol (96%) hirviendo durante 10 min. Las muestras se observaron en un microscopio óptico. El peróxido de hidrógeno se visualizó por la formación de un precipitado de color café rojizo en el tejido (Thordal-Christensen *et al.*, 1997). La acumulación de especies reactivas de oxígeno se analizó de acuerdo al procedimiento descrito por Zheng *et al.* (2019).

Análisis de la función y actividad de TOR

El análisis de la función de TOR se realizó utilizando el inhibidor AZD8055 y la línea mutante *tor-es* inducible por estradiol. Para esto, plántulas de 3 días de germinación se trasplantaron a cajas de Petri conteniendo el inhibidor AZD8055 a una concentración de 1 μM , y estradiol a una concentración de 0.07 μM (Zhang *et al.*, 2016). Las plántulas se crecieron durante 6 días en una cámara de crecimiento y se midieron los parámetros de crecimiento. La actividad de TOR se analizó por la fosforilación de la proteína S6k, la cual es el blanco inmediato de TOR, de acuerdo al procedimiento descrito por Reyes-de la Cruz *et al.* (2004).

Análisis estadístico

Los experimentos se repitieron tres veces, con tres replicas en cada experimento y 10 plantas por cada réplica. Los datos fueron procesados para obtener la media y la desviación estándar.

Resultados

Efecto de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 sobre el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*

Se analizó el efecto de Sp245 sobre las plántulas de *Arabidopsis* 6 días después de la inoculación. La morfología de las plántulas se modificó en respuesta

a la inoculación (**Fig. 1a**), la longitud de la raíz primaria disminuyó (**Fig. 1b**), y el número de raíces laterales se incrementó (**Fig. 1c**). Aunque en esta etapa no se observó un cambio importante sobre la biomasa en las plantas inoculadas, se apreció un incremento en el tamaño del follaje (**Fig. 1a, d**). Por otra parte, se redujo el número de células que

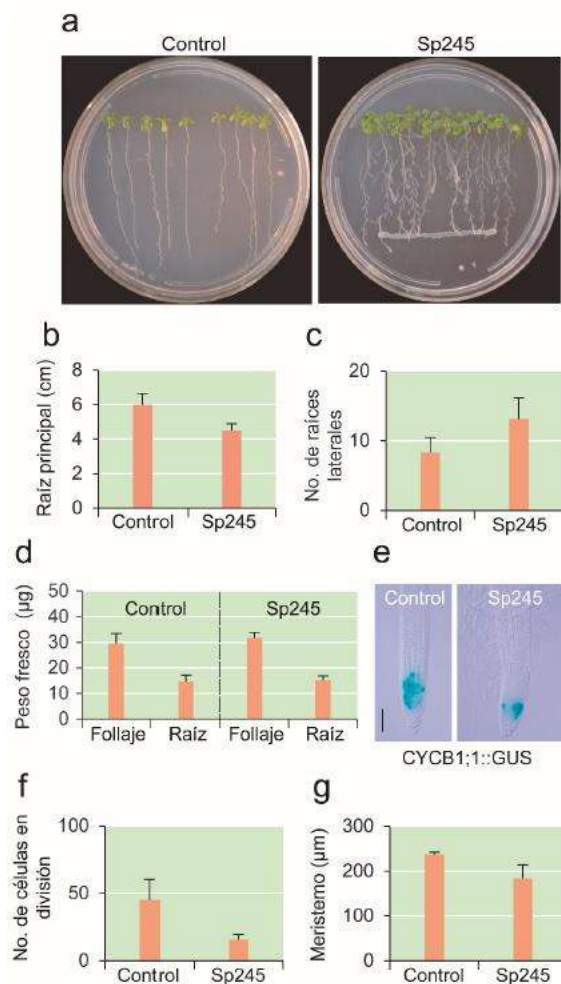


Figura 1. Efecto de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 sobre *Arabidopsis thaliana*. Las plantas fueron inoculadas con Sp245, se crecieron durante 6 días y se analizaron los parámetros de crecimiento. a) Imagen de las plantas inoculadas y no inoculadas. b, c) Análisis de parámetros de la raíz. d) Peso fresco. e) Análisis del marcador de división celular CYCB1;1::GUS. f) Número de células en división. g) Longitud del meristemo de la raíz principal. Barra=100 μm. n=30.

expresaban CYCB1:1::GUS, lo cual correlacionó con la reducción en el tamaño del meristemo y el acortamiento de la raíz (Fig. 1e-g).

Efecto del ácido ascórbico sobre el crecimiento de *Arabidopsis*

El análisis de la acumulación de ácido ascórbico en las plántulas en respuesta a la inoculación con Sp245 indica un incremento en el follaje de las plántulas inoculadas, pero no se observaron cambios en la raíz, en relación con las plántulas no inoculadas (Fig. 2a). Estos resultados sugieren que Sp245 puede estimular la biosíntesis de ácido ascórbico específicamente en el follaje de *Arabidopsis*.

Para conocer la influencia del ácido ascórbico sobre el desarrollo vegetal, se aplicó 1 y 2 mM del compuesto al medio de cultivo, con lo que se observó una inhibición del crecimiento, siendo este más evidente en la concentración de 2 mM (Fig. 2b). El análisis del crecimiento de la raíz, formación de raíces laterales, biomasa radical y del follaje, indica un efecto represor para cada uno de estos parámetros, dependiente de la concentración utilizada, a mayor concentración de ácido ascórbico se notó un efecto inhibitorio mayor (Fig. 2c-f).

Efecto del ácido ascórbico sobre la expresión de TOR

La cinasa TOR es un regulador clave para el crecimiento celular. A continuación, para conocer el efecto del AA sobre TOR, se analizó la expresión del reportero TOR::GUS en el meristemo de la raíz de plántulas crecidas durante 6 días en presencia de 1 mM de ácido ascórbico. Inicialmente, se analizó la expresión del reportero con la inoculación de la rizobacteria, y se observó una considerable disminución en su expresión (Fig. 3a). El tratamiento con ácido ascórbico disminuyó la expresión del reportero en una magnitud similar a la observada con la rizobacteria (aproximadamente 70%) (Fig. 3b, c).

Los resultados anteriores sugieren que la influencia de ácido ascórbico sobre TOR podría tener una función relevante en la modulación de la morfología de *Arabidopsis*. Para analizar esta posibilidad, se utilizó la línea *tor-es*, en la que se

inhibe de la expresión de TOR con la aplicación de estradiol. Se inocularon plántulas de *Arabidopsis* con Sp245 en ausencia y en presencia de estradiol y se observó que el estradiol inhibe marcadamente el crecimiento y el desarrollo de las plántulas (Fig. 3d). La longitud de la raíz principal se inhibió aproximadamente 70 % y en número de raíces laterales en un 100 % (Fig. 3e, f), con lo que TOR podría estar modulando la respuesta de bioestimulación a Sp245.

Efecto del ácido ascórbico sobre la división celular en el meristemo de la raíz

La división celular determina el crecimiento y desarrollo de los tejidos de la planta. A continuación se analizó el efecto de 1 mM de ácido ascórbico y del inhibidor de TOR AZD8055 (1 μ M) sobre la expresión del reportero de división celular CYCB1:1::GUS en el meristemo de la raíz principal. La expresión del marcador fue visiblemente más baja en presencia de ácido ascórbico que en las plántulas control no tratadas. El inhibidor AZD8055 también inhibió su expresión cuando se aplica solo o en combinación con la rizobacteria (Fig. 4a). La inhibición de la división celular correlacionó con menor crecimiento de las plántulas, en aproximadamente un 50 % con ambos tratamientos, en relación con el control (Fig. 4b, c).

Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la expresión y la actividad de TOR

Para explorar un posible mecanismo de acción del ácido ascórbico en la represión del crecimiento de *Arabidopsis*, se analizó su efecto sobre la producción de peróxido de hidrógeno en la raíz principal. Como primer experimento se analizó la producción de especies reactivas de oxígeno en la raíz de plantas inoculadas con la rizobacteria. Se observó un incremento en su producción en la zona del meristemo de la raíz en plantas inoculadas (Fig. 5a). Las plántulas tratadas con 1 mM de ácido ascórbico o 1 μ M AZD8055 mostraron un aumento en la producción de peróxido de hidrógeno, con un incremento mayor observado con AZD8055 (Fig. 5b). Posteriormente, se analizó el efecto de dos concentraciones de peróxido de hidrógeno (0.5 y 1 mM) sobre la

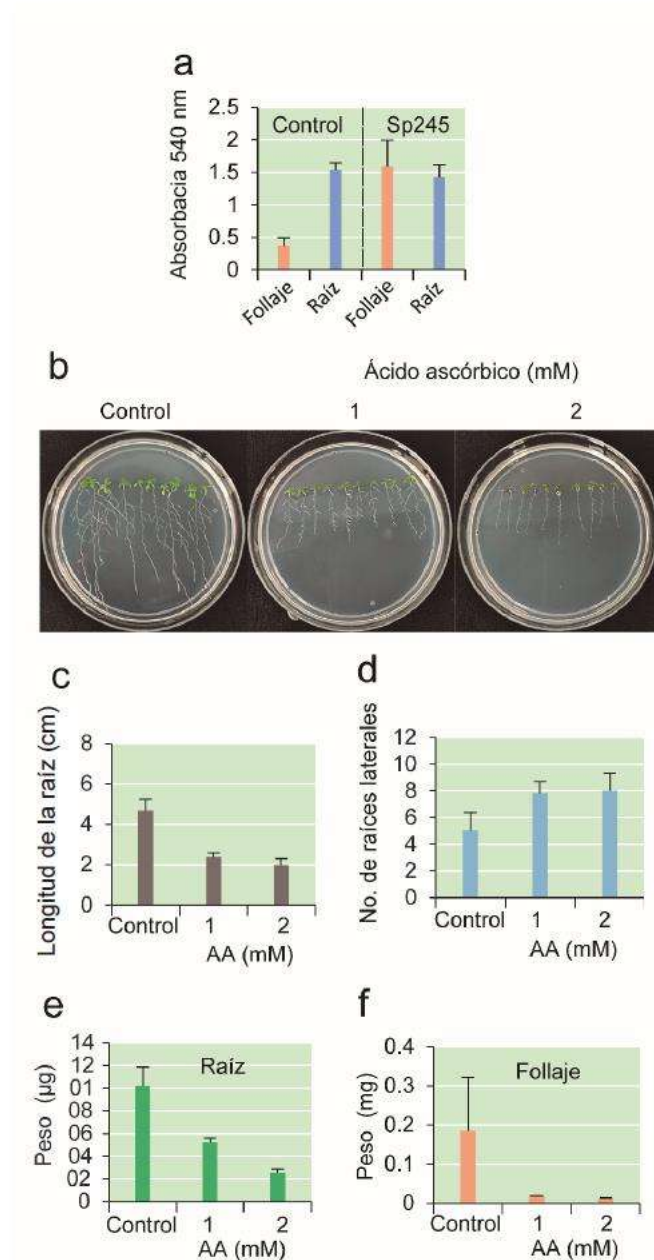


Figura 2. Acumulación de ácido ascórbico y su efecto sobre el crecimiento de *Arabidopsis*. a) Acumulación de ácido ascórbico en follaje y raíz. b) Imágenes de plantas tratadas con diferentes concentraciones de ácido ascórbico. c-f) Parámetros del crecimiento de plantas tratadas con AA. AA=ácido ascórbico. n=30.

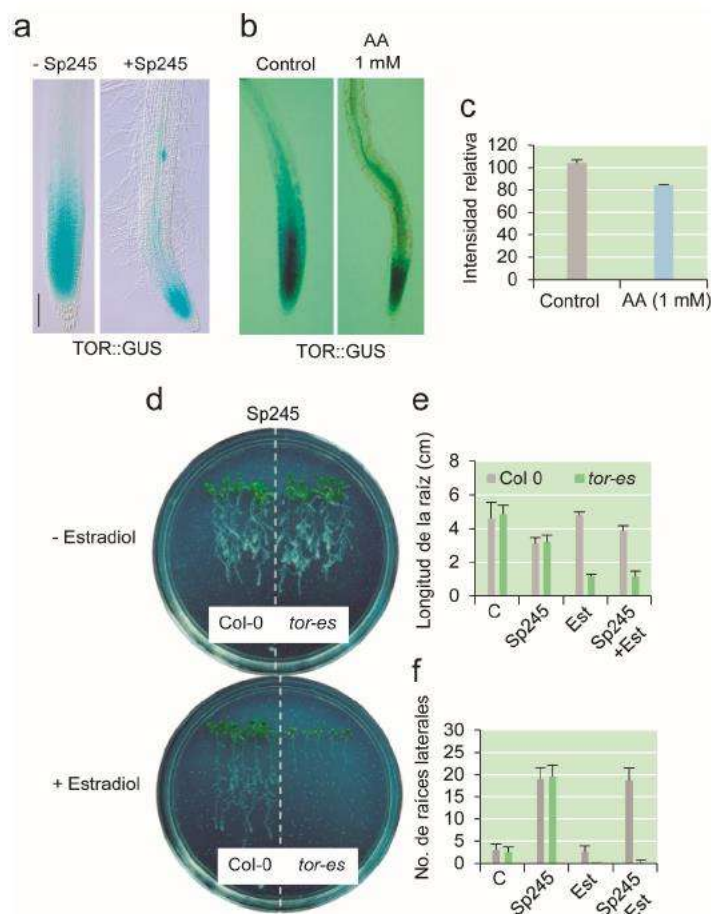


Figura 3. Efecto del ácido ascórbico sobre la expresión de TOR en *Arabidopsis*. **a)** Expresión del reportero TOR::GUS en el meristemo de la raíz principal de plantas inoculadas con Sp245 (**a**), o tratadas con ácido ascórbico (**b**, **c**). **d)** Imágenes de plantas silvestres y mutantes *tor-es* tratadas con estradiol e inoculadas con Sp25. (**e**, **f**) Parámetros de crecimiento de la raíz. Barra=200 μ m. n=30.

expresión de TOR. Con la concentración menor de peróxido de hidrógeno se observó un incremento en la expresión en el meristemo de la raíz, pero con la concentración mayor se notó una disminución en la expresión de aproximadamente 50 %, en relación al control (**Fig. 5c**, **d**).

También se analizó la actividad de TOR por medio de la fosforilación de la proteína S6K, la cual es un blanco directo de su actividad. Los resultados

mostraron una inhibición de la fosforilación de S6K dependiente de la concentración de peróxido de hidrógeno utilizada (**Fig. 5e**). Además, las dos concentraciones de peróxido de hidrógeno inhibieron el crecimiento de la planta, así como el de los pelos radiculares (**Fig. 5f**). Estos resultados sugieren que el ácido ascórbico podría modificar el crecimiento de *Arabidopsis* modulando la producción o la acumulación de peróxido de hidrógeno.

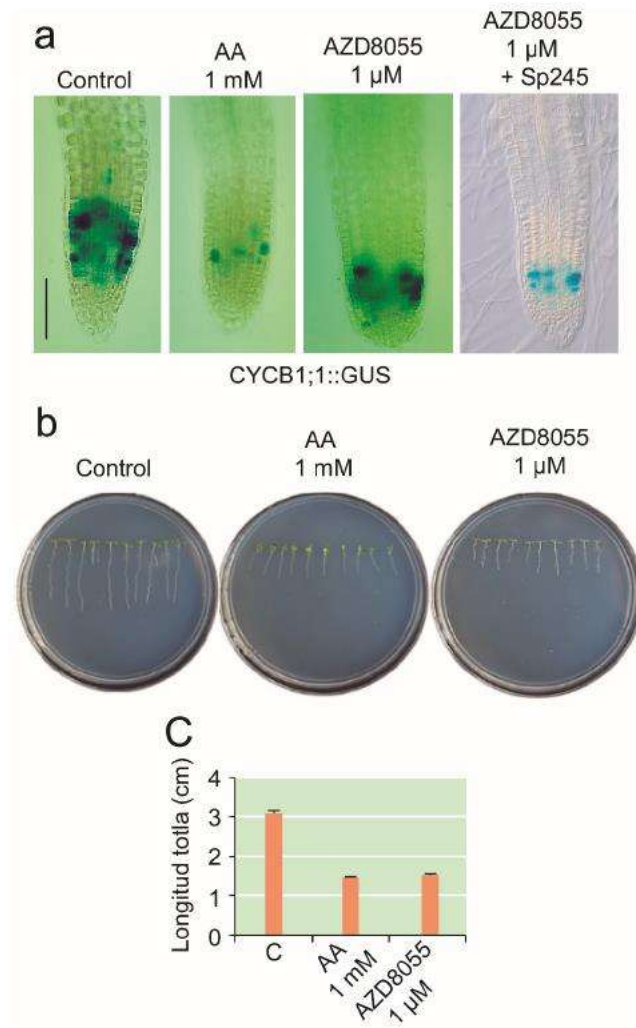


Figura 4. Efecto del ácido ascórbico y de la inhibición de TOR por AZD8055 sobre la división celular y el crecimiento de la raíz. a) Expresión del reportero de división celular CYCB1;1::GUS en el meristemo de la raíz principal. (b, c) Imágenes de plantas crecidas in vitro y longitud total de plantas tratadas con ácido ascórbico y AZD8055. Barra=100 μ m. n=30.

Discusión

El ácido ascórbico es el compuesto antioxidante más abundante, esencial para diversas funciones biológicas en las plantas (Chaturvedi *et al.*, 2022), y desempeña un papel importante en la división

y expansión celular (Zheng *et al.*, 2022). Sin embargo, no se ha analizado su función para la bioestimulación por rizobacterias.

En nuestro estudio, se observó un incremento de ácido ascórbico de aproximadamente 2 veces en el

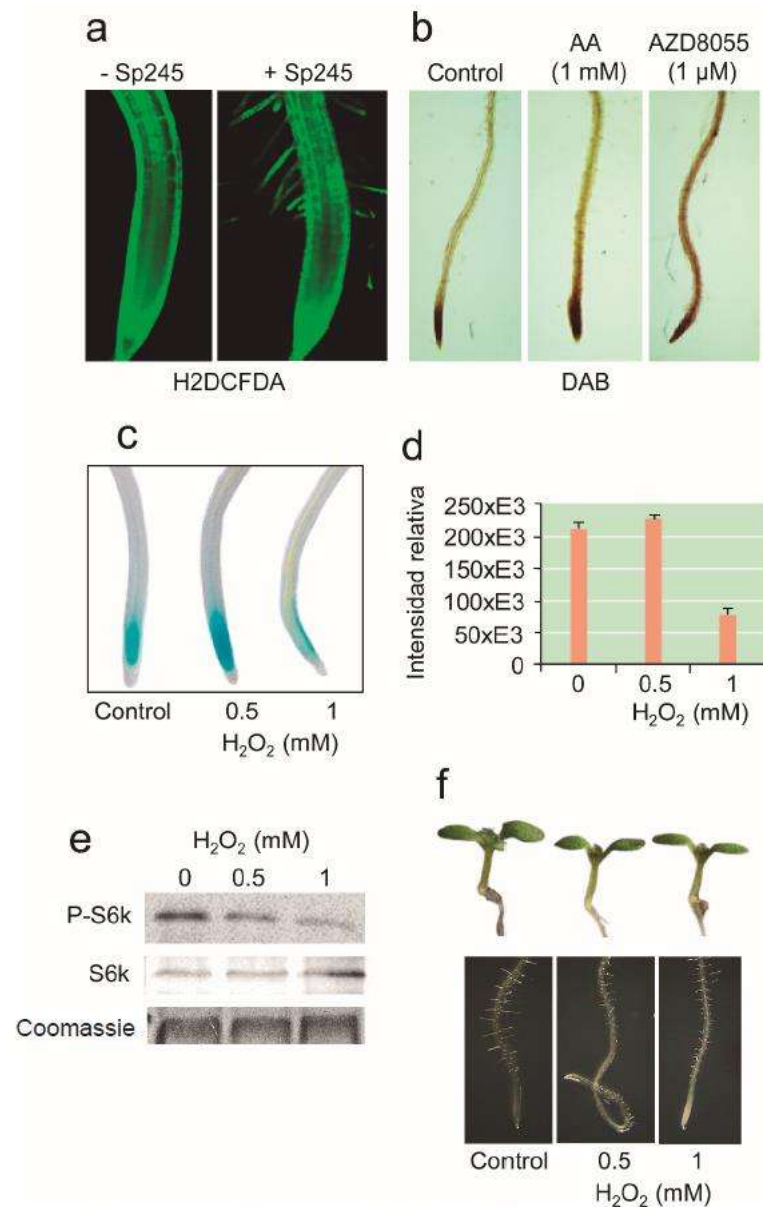


Figura 5. Producción y efecto de peróxido de hidrógeno sobre la expresión y actividad de TOR en la raíz. **a, b)** Análisis de acumulación de peróxido de hidrógeno por tinción del tejido con H2DCFDA y DAB. **(c, d)** Expresión del reportero TOR::GUS en el meristemo de la raíz principal. **e)** Actividad de TOR por fosforilación de S6K. **f)** Crecimiento de plantas tratadas con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno. n=30, para e, n=3.

follaje de *Arabidopsis* en respuesta a la inoculación con *A. baldaniorum* Sp245, y su aplicación inhibió el crecimiento en magnitud dependiente de la concentración utilizada. En el melón (*Cucumis melo* L.) la supresión de ascorbato oxidasa (AO), enzima que cataliza la oxidación de ácido ascórbico a ácido deshidroascórbico, incrementó el contenido de ácido ascórbico en el fruto y se redujo dramáticamente su crecimiento debido a una interferencia con la elongación celular (Chatzopoulou *et al.*, 2020). En *Arabidopsis* la sobre-expresión de la enzima glucuronocinasa, la cual desvía la conversión del ácido glucurónico, un precursor para la síntesis de ácido ascórbico, hacia la síntesis de carbohidratos, mostró una disminución en el contenido de ácido ascórbico, y un incremento en la longitud de la raíz en condiciones de estrés abiótico (Thakur *et al.*, 2023). Uno de los efectos de Sp245 sobre la morfología de la raíz de *Arabidopsis* es una disminución en su crecimiento y un incremento en la formación de raíces laterales. Estos datos sugieren que Sp245 podría modular la bioestimulación de *Arabidopsis* a través de los cambios en los niveles de ácido ascórbico.

Posteriormente, nuestro estudio se enfocó en explorar el mecanismo por el cual el ácido ascórbico podría disminuir el crecimiento de *Arabidopsis*. TOR es una cinasa clave en la ruta metabólica que regula el crecimiento celular (Reyes de la Cruz *et al.*, 2004), por lo tanto, se analizó el efecto de ácido ascórbico sobre la expresión de TOR. Se observó que la expresión de la cinasa disminuyó en respuesta al tratamiento con ácido ascórbico. Esta disminución podría correlacionar con el incremento en la acumulación de ácido ascórbico y la disminución del crecimiento de *Arabidopsis* por Sp245, con la actividad de TOR. Esta posibilidad se sustenta por los resultados observados con la inhibición de la expresión de TOR utilizando las plantas de la línea *tor-es* en la interacción planta-bacteria. En esta línea no se observó la bioestimulación de *Arabidopsis* ante la represión de TOR, sugiriendo que esta enzima es importante para las respuestas a la rizobacteria.

La ruta metabólica de TOR modula la división celular regulando la transición G1/S del ciclo

celular (Ahmad *et al.*, 2019). Así, para estudiar con más detalle el efecto del ácido ascórbico sobre esta ruta, se analizó la expresión de la ciclina B1;1 en respuesta al tratamiento con esta molécula. El ácido ascórbico disminuyó la expresión de la ciclina notablemente. Además, esta disminución fue observada en el tratamiento con el inhibidor de TOR AZD8055. Estos resultados fueron consistentes con una disminución en el crecimiento de *Arabidopsis*. Lo anterior sugiere que la disminución en el crecimiento de *Arabidopsis* por ácido ascórbico es probablemente debido a la inhibición de la actividad de TOR, que a su vez bloquea la división celular.

El mecanismo de acción del ácido ascórbico sobre la ruta metabólica de TOR aún se desconoce, tanto en animales como en plantas. El ácido ascórbico es un metabolito con propiedades antioxidantes que regula los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) en la célula (Chaturvedi *et al.*, 2022). Considerando lo anterior, se analizó su efecto sobre la acumulación de peróxido de hidrógeno en la raíz de *Arabidopsis*. Su adición incrementó la acumulación de peróxido de hidrógeno, y disminuyó la expresión de TOR en la concentración más alta utilizada (1 mM). Además, el peróxido de hidrógeno inhibió la fosforilación de la proteína S6K, el blanco inmediato de TOR en la ruta metabólica. Estos efectos sobre TOR correlacionaron con una disminución en el crecimiento de *Arabidopsis*. El ácido ascórbico es un potente antioxidante que dona electrones a los radicales libres, estabilizándolos y previniendo el daño celular (Carr y Frei, 1999). Sin embargo, en presencia de iones de metales de transición (como hierro y cobre) o en altas concentraciones, el ácido ascórbico puede reducir estos metales, lo que lleva a la generación de radicales libres mediante reacciones de Fenton. Esta actividad pro-oxidante puede provocar estrés oxidativo (Buettner y Jurkiewicz, 1996). El equilibrio entre su función antioxidante y pro-oxidante depende del entorno biológico y químico específico. Así, es probable que en nuestro estudio la concentración utilizada y el tiempo de exposición estén favoreciendo la actividad pro-oxidante del ácido ascórbico, aumentando la producción de peróxido de hidrógeno en la raíz. Este efecto podría ser el responsable de

la inhibición de la ruta de TOR por ácido ascórbico, del desarrollo y la disminución del crecimiento de las plantas.

El ácido ascórbico tiene un papel importante en la interacción de las rizobacterias con las plantas. En chícharo, se estudió la actividad de *Rhizobium* y la aplicación de ácido ascórbico sobre el incremento en el tamaño de la raíz y la productividad de la planta. En la concentración de 200 ppm de ácido ascórbico se notó un incremento en el crecimiento vegetativo, en el número de vainas por planta, en el número de semillas y en los parámetros bioquímicos de clorofila y carotenoides (Kamran *et al.*, 2023), lo que sugiere que el ácido ascórbico mejora el resultado de la interacción.

El ácido ascórbico también podría favorecer la actividad de bacterias benéficas a través de su capacidad antioxidante, disminuyendo la producción de especies reactivas de oxígeno. En la interacción entre *Azotobacter chroococcum* Avi2 con el arroz, altas concentraciones de peróxido de hidrógeno (2.5 mM-4.5 mM) mostraron una alta mortalidad de Avi2, pero cuando se adiciona 1 ppm de ácido ascórbico se neutraliza su efecto. También se incrementó la actividad de las enzimas relacionadas con el metabolismo del peróxido de hidrógeno, y los porcentajes de germinación se incrementaron en comparación con la aplicación de peróxido de hidrógeno solo. Estos datos sugieren que el ácido ascórbico neutraliza el estrés oxidativo provocado por el peróxido de hidrógeno e incrementa la eficacia de Avi2 sobre la planta (Kumar *et al.*, 2019). En conclusión, nuestros datos muestran que el ácido ascórbico está relacionado con los cambios morfológicos promovidos por Sp245 en *Arabidopsis*.

Referencias

- Ahmad Z, Magyar Z, Bögre L, Papdi C (2019). Cell cycle control by the target of rapamycin signalling pathway in plants: *Journal of Experimental Botany* 70:2275-2284. doi:10.1093/jxb/erz140.
- Apel K, Hirt H (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, signal transduction: *Annual Review of Plant Biology* 55:373-399. doi:10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701.
- Buettner GR, Jurkiewicz BA (1996). Catalytic metals, ascorbate free radicals: combinations to avoid: *Radiation Research* 145:532-541.
- Carr AC, Frei B (1999). Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant health effects in humans: *The American Journal of Clinical Nutrition* 69:1086-1107.
- Carro L, Torres R, Trujillo ME (2018). *Azospirillum baldaniorum* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a biopurification system on a herbicide-producing plant factory: *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 68:1240-1245. doi:10.1099/ijsem.0.002648.
- Chaturvedi S, Khan S, Bhunia RK, *et al.* (2022). Metabolic engineering in food crops to enhance ascorbic acid production: crop biofortification perspectives for human health: *Physiological Molecular Biology of Plants* 28:871-884. doi:10.1007/s12298-022-01172-w.
- Chatzopoulou F, Sanmartin M, Mellidou I, Pateraki I, Koukounaras A, Tanou G, Kalamaki MS, Veljović-Jovanović S, Antić TC, Kostas S, Tsovaltzis P, Grumei R, Kanellis AK (2020). Silencing of ascorbate oxidase results in reduced growth, altered ascorbic acid levels ripening pattern in melon fruit: *Plant Physiology Biochemistry* 156:291-303. doi:10.1016/j.plaphy.2020.08.040.
- Claeys H, Van Landeghem S, Dubois M, Maleux K, Inzé D (2014). What is stress? Dose-response effects in commonly used *in vitro* stress assays. *Plant Physiology* 165, 519-527. doi:10.1104/pp.113.234641.
- 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 Journal* 20:503-508.
- Crespo JL, Díaz-Troya S, Florencio FJ (2005). Inhibition of target of rapamycin signaling by rapamycin in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: *Plant Physiology* 139:1736-1749. doi:10.1104/pp.105.067744.
- Davies SHR, Masten SJ (1991). Spectrophotometric method for ascorbic acid using dichlorophenolindophenol: elimination of the interference due to iron: *Analytica Chimica Acta* 248:225-227. doi:10.1016/S0003-2670(00)80888-0.
- Foyer CH, Noctor G (2011). Ascorbate glutathione: the heart of the redox hub: *Plant Physiology* 155:2-18. <https://doi.org/10.1104/pp.110.167569>.
- Gullner G, Komives T, Király L, Schröder P (2018). Glutathione S-transferase enzymes in plant-pathogen interactions: *Frontiers in Plant Science* 9:1836. doi:10.3389/fpls.2018.01836.

7.3.2. Lipopolisacáridos: Moléculas clave en las interacciones bacterianas.

U.M.S.N.H. | Año 12/Marzo-Abril/ No. 68

ARTÍCULO

Lipopolisacáridos: Moléculas clave en las interacciones bacterianas

Alma Alejandra Hernández-Esquivel y Ernesto García-Pineda



Alma Alejandra Hernández-Esquivel. Estudiante del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Experimental, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán.

0939557x@umich.mx

Ernesto García-Pineda. Profesor e Investigador del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán.

egpineda@umich.mx

Las bacterias son organismos procariotas que están presentes en todas las superficies del planeta, viviendo algunas especies en condiciones extremas de temperatura y de presión. Su distribución es tan amplia que tanto los tejidos vegetales como el cuerpo humano, son albergues perfectos para que crezcan dentro y sobre nosotros. Estos microorganismos pueden tener efectos benéficos o perjudiciales dependiendo de su tipo, su función o del tamaño de su población.

Las plantas y los animales han desarrollado un sistema inmunológico innato que se encuentra en

- Kamran A, Mushtaq M, Arif M, Rashid S (2023). Role of biostimulants (ascorbic acid fulvic acid) to synergize *Rhizobium* activity in pea (*Pisum sativum* L. var. Meteor): *Plant Physiology Biochemistry* 196:668–682. doi:10.1016/j.plaphy.2023.02.018.
- Kim YC, Leveau J, McSpadden Gardener BB, Pierson EA, Pierson LS, Ryu CM (2014). The multifactorial basis for plant health promotion by plant-associated bacteria: *Applied Environmental Microbiology* 77:1548–1555. doi:10.1128/AEM.01867-10.
- Kumar U, Kaviraj M, Panneerselvam P, Priya H, Chakraborty K, Swain P, Chatterjee SN, Sharma SG, Nayak PK, Nayak AK (2019). Ascorbic acid formulation for survivability diazotrophic efficacy of *Azotobacter chroococcum* Axi2 (MCC 3432) under hydrogen peroxide stress its role in plant-growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.): *Plant Physiology Biochemistry* 139:419–427. doi:10.1016/j.plaphy.2019.04.003.
- Li C, Jia H, Chai Y, et al. (2018). *Arabidopsis* root growth inhibition by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, but not by naphthaleneacetic acid, depends on ethylene-mediated signaling: *Frontiers in Plant Science* 10:918. doi:10.3389/fpls.2019.00918.
- Li X, Ye J, Munir S, Yang T, Chen W, Liu G, Zheng W, Zhang Y (2019). Biosynthetic gene pyramiding leads to ascorbate accumulation with enhanced oxidative stress tolerance in tomato: *International Journal of Molecular Science* 20:1558. doi:10.3390/ijms20071558.
- Malamy JE, Benfey PN (1997). Organization cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*: *Development* 124:33–44. doi:10.1242/dev.124.1.33.
- MenB, Desnos T, Nussaume LF Berger, Bouchez D, Meyer C, Robaglia C (2002). Expression disruption of the *Arabidopsis* TOR (target of rapamycin) gene: *Proceedings National Academy of Sciences U S A*. 99:6422–6427.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004). Reactive oxygen gene network of plants: *Trends in Plant Science* 9:490–498. doi:10.1016/j.tplants.2004.08.009.
- Reyes de la Cruz H, Aguilar R, Sanchez de Jimenez E. (2004). Functional characterization of a maize ribosomal S6 protein kinase (ZmS6K), a plant ortholog of metazoan p70(S6K): *Biochemistry* 43:533–539.
- Smirnoff N, Wheeler GL (2000). Ascorbic acid in plants: Biosynthesis function: *Critical Reviews in Biochemistry Molecular Biology* 35:291–314. doi:10.1080/10409230008984166.
- Thakur N, Flowerika, Chaturvedi S, Tiwari S (2023). Wheat derived glucuronokinase as a potential target for regulating ascorbic acid phytic acid content with increased root length under drought ABA stresses in *Arabidopsis thaliana*: *Plant Science* 331:111671. doi:10.1016/j.plantsci.2023.111671.
- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB (1997). Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae hypersensitive response during the barley—powdery mildew interaction: *Plant Journal* 11:1187–94.
- Veljovic-Jovanovic S, Noctor G, Foyer CH (2002). Are leaf hydrogen peroxide concentrations commonly overestimated? The potential influence of artefactual interference by tissue phenolics ascorbate. *Plant Physiology Biochemistry* 40:501–507. doi:10.1016/S0981-9428(02)01313-0.
- Xiong Y, Sheen J (2012). Rapamycin glucose-target of rapamycin (TOR) protein signaling in plants: *Journal of Biological Chemistry* 287:2836–42. doi:10.1074/jbc.M111.300749.
- Zhang Z, Zhu JY, Roh J, Marchive C, Kim SK, Meyer C, Sun Y, Wang W, Wang ZY (2016). TOR signaling promotes accumulation of BZR1 to balance growth with carbon availability in *Arabidopsis*: *Current Biology* 26:1854–60. doi:10.1016/j.cub.2016.05.005.
- Zheng X, Gong M, Zhang Q, Tan H, Li L, Tang Y, Li Z, Peng M, Deng W (2022). Metabolism regulation of ascorbic acid in fruits: *Plants* 11:1602. doi:10.3390/plants11121602.
- Zheng Z, Wang Z, Wang X, Liu D (2019). Blue light-triggered chemical reactions underlie phosphate deficiency-induced inhibition of root elongation of *Arabidopsis* seedlings grown in Petri dishes: *Molecular Plant* 12:1515–1523. doi:10.1016/j.molp.2019.08.001.

constante alerta para responder a una amplia gama de moléculas microbianas para poder prevenir o combatir una infección. Asimismo, la capacidad de percibir las moléculas microbianas es fundamental para establecer las relaciones de simbiosis o de inmunidad.

Las bacterias se pueden clasificar como Gram positivas o Gram negativas, de acuerdo a su reacción a la tinción de Gram. Las Gram positivas adquieren una coloración azul oscuro o violeta, mientras que las Gram negativas una coloración rosa. Lo anterior es importante en el mundo de la medicina, ya que permite elegir un antibiótico adecuado al momento de combatir una infección. La diferencia en coloración se debe a la estructura de su envoltura celular: en bacterias Gram positivas, esta comprende una membrana citoplasmática y una pared celular compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano que ayuda a la retención del colorante; mientras que las Gram negativas poseen dos membranas lipídicas entre las que se localiza una fina pared celular de peptidoglicano que permite el escape del colorante. En estas bacterias se encuentran ancladas en la membrana externa moléculas llamadas lipopolisacáridos (LPS).

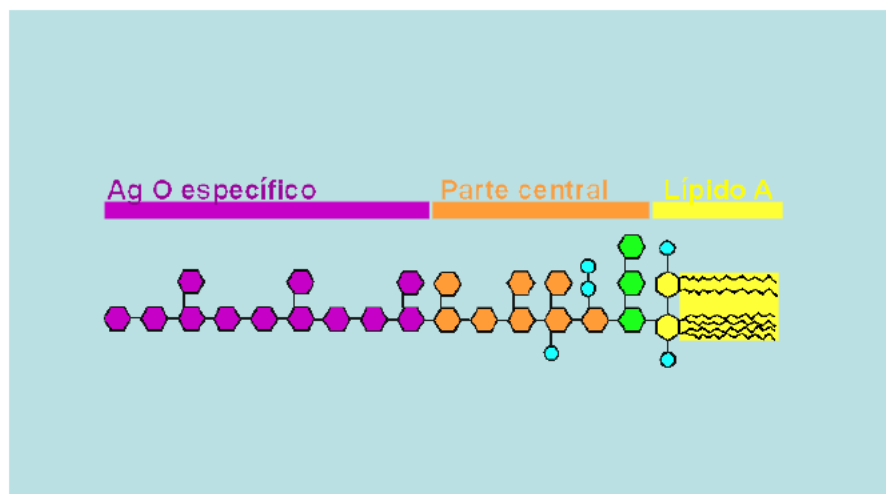
En las últimas décadas se han realizado importantes avances para entender la participación de los lipopolisacáridos en las interacciones bacte-

rianas con organismos eucariotas. Estos incluyen los mecanismos de reconocimiento y las respuestas que desencadenan, las cuales resultan interesantes de conocer ya que todos los días nos encontramos expuestos a ellos.

¿Qué son los lipopolisacáridos?

Los lipopolisacáridos son moléculas formadas por lípidos y carbohidratos, de ahí su nombre. A la porción lipídica se le denomina **lípidio A**, mientras que los carbohidratos se dividen a su vez en dos regiones, un núcleo con un número variable de azúcares unido a una larga cadena de unidades repetidas de monosacáridos conocida como **antígeno O**.

La función principal de los lipopolisacáridos es **mantener la rigidez de la membrana externa** bacteriana haciéndola menos permeable, creando una barrera para protegerla de detergentes, antibióticos y toxinas, pero a la vez **manteniendo la fluidez** para permitir el paso de nutrientes. Al encontrarse en el exterior de la superficie celular, participan en la **interacción de las bacterias con otras células**, siendo reconocidos como toxinas por el sistema inmune de los animales. La **región lipídica** es la parte de la molécula que **reconoce el sistema inmune** del hospedero, mientras que la **región del núcleo** y del **antígeno O**, intervienen en los procesos de **adhesión al huésped**, promoviendo su virulencia.





Se tiene evidencia de que los lipopolisacáridos de bacterias que carecen del antígeno O y de su núcleo de oligosacáridos, son menos virulentos y casi no pueden sobrevivir dentro de sus huéspedes. Además, la región del antígeno O presenta variaciones en el número y en la composición de azúcares entre especies bacterianas, confiriéndoles una especificidad serológica que permite su identificación y clasificación en serotipos, lo cual ayuda a diferenciar a las bacterias a nivel de subespecie.

Detección de los lipopolisacáridos en humanos

En mamíferos se ha estudiado con detalle el proceso de reconocimiento de los lipopolisacáridos. Se sabe que para ser reconocidos por el sistema inmune son desprendidos de la membrana bacteriana por acción de la proteína de unión al lipopolisacárido LBP (*Lipopolysaccharide Binding Protein*) presente en el suero humano, formando un complejo LBP/LPS que se une a una proteína de membrana, la CD14 (*Cluster of Differentiation 14*), y dependiendo del tipo celular, puede funcionar como un receptor y activar una respuesta, o trans-

ferirlo a un complejo proteico TLR4/MD-2 (*Toll-like Receptor 4 / Myeloid Differentiation 2*). La proteína TLR4 pertenece a un grupo de receptores que reconocen moléculas componentes de la estructura de los microorganismos. Por esta característica, se denominan Receptores de Reconocimiento de Patrones moleculares o PRR (*Pattern Recognition Receptor*), los cuales están ubicados en la superficie de la célula y en citosol, y son requeridos para activar las respuestas de defensa inducidas por lipopolisacáridos como la inflamación, fiebre, activación de fagocitos (células inmunitarias encargadas de destruir organismos patógenos) y, en casos severos, sepsis o choque séptico como resultado de una respuesta inflamatoria exagerada.

Detección de los lipopolisacáridos en plantas

En las plantas, el proceso de reconocimiento de lipopolisacáridos es poco conocido. En *Arabidopsis thaliana* se encontró una proteína a la que se llamó Estimulación Reducida Específica por Lipooligosacárido, LORE (*Lipooligosaccharide-Especific*

Reduced Elicitacion), la cual se requiere para percibir lipopolisacáridos de dos géneros de bacterias *Pseudomonas* y *Xanthomonas*. Esta proteína se identificó como un receptor tipo PRR, que requiere la molécula completa de lipopolisacárido o la región del lípido A para inducir la respuesta inmune de las plantas. Sin embargo, se desconoce si los lipopolisacáridos se tienen que encontrar dentro o fuera de la célula para hacer más accesible su unión al receptor, y si estos se unen directamente a LORE, o si se requiere la presencia de un correceptor, como en el caso de los mamíferos.

Recientemente, en plantas de arroz fue reportado otro receptor PRR involucrado en el reconocimiento de lipopolisacárido llamado Receptor Cinasa 1 del Elicitor Quitina, CERK1 (*Chitin Elicitor Receptor Kinase 1*). Anteriormente, esta proteína se había reportado como un receptor de la quitina (un carbohidrato que forma parte de la pared celular de los hongos) y posee un dominio involucrado en la percepción del Lípido A, pero ha sido poco estudiado.

Una diferencia sorprendente entre la detección de lipopolisacáridos en mamíferos y plantas es que para las plantas se requieren altas concentraciones, a saber, en un rango de 50 a 100 microgramos por mililitro, en contraste con las concentraciones picomolares de lipopolisacáridos en mamíferos, es decir, un millón de veces menos para que se active el sistema inmune.

Efectos de lipopolisacáridos de bacterias patógenas en las plantas

En las plantas, los lipopolisacáridos inducen la producción de compuestos antimicrobianos y la resistencia a las infecciones microbianas, a través de un fenómeno conocido como respuesta hipersensible que se caracteriza por la estimulación de la muerte celular en tejidos cerca de la infección para evitar la propagación de patógenos en los tejidos vegetales.

Los lipopolisacáridos de bacterias patógenas de los géneros *Erwinia*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Xylella*, *Burkholderia* y *Pseudomonas*, estimulan el aumento del flujo de iones calcio al interior de la membrana, es decir al citosol, donde el calcio actúa como un segundo mensajero que desencadena una cascada de respuestas de defensa como la producción de especies reactivas de oxígeno, una de ellas es el óxido nítrico que participa en la expresión de genes de defensa y en la activación de proteínas relacionada con la patogénesis (PRP; *Pathogenesis-Related Proteins*) para atacar y eliminar a las bacterias. Además, aumentan la acumulación de compuestos fenólicos que funcionan como agentes antimicrobianos, a la vez que participan en el reforzamiento de la pared celular para evitar que las bacterias penetren en las células sanas. Los lipopolisacáridos de las bacterias patógenas *Pectobacterium atrosepticum* y *Pectobacterium carotovorum*, inducen respuestas diferentes en comparación con



bacterias no patógenas de plantas, como la inducción de la muerte celular programada, la alcalinización en el medio, el tiempo de generación de especies reactivas de oxígeno y la inducción de genes de defensa, lo que sugiere que los lipopolisacáridos de bacterias patógenas y no patógenas, **activan diferentes respuestas en las plantas.**

Efecto de lipopolisacáridos de bacterias benéficas de plantas

Los lipopolisacáridos provenientes de bacterias promotoras del crecimiento vegetal estimulan el **crecimiento de las plantas y mejoran su productividad.** Por ejemplo, en las relaciones simbióticas de leguminosas con bacterias del género *Rhizobium*, los lipopolisacáridos favorecen el establecimiento de la interacción para la formación de nódulos que son las estructuras donde viven las bacterias. En plantas de trigo, la aplicación de lipopolisacáridos de *Azospirillum brasilense*, en condiciones de invernadero, aumentó la longitud de la lámina foliar, de la raíz y el peso fresco. También se aceleró la formación de espigas y la división celular en las raíces. Además, se estimularon algunas respuestas bioquímicas relacionadas con la defensa como la actividad de las enzimas peroxidasas, la producción de especies reactivas de oxígeno y el flujo de calcio. En otro estudio con lipopolisacáridos de *Azospirillum*, se reportó que estimulan la morfogénesis de tejidos no diferenciados de trigo. Además, se ha observado que la promoción del crecimiento vegetal por lipopolisacáridos de bacterias benéficas, está relacionado con la estimulación de rutas bio-

químicas que **regulan el metabolismo celular** que conduce a la proliferación celular, el crecimiento y el desarrollo celular.

¿Hacia dónde avanzan las investigaciones con lipopolisacáridos?

Las investigaciones actuales con lipopolisacáridos están enfocadas en conocer su **participación en enfermedades como el cáncer**, ya que se ha revelado que la activación inmunitaria por los lipopolisacáridos puede ser perjudicial debido a que el receptor de LPS, el TLR4, desempeña un papel clave al permitir que las células cancerosas crezcan y promueve la metástasis.

Asimismo, su efecto inmunoestimulante se utiliza para el **desarrollo de vacunas** y otros tratamientos inmunoterapéuticos. Los lipopolisacáridos pueden servir como un marcador de **diagnóstico temprano para infecciones.** En la investigación clínica, las preparaciones de lipopolisacáridos son útiles para dilucidar la biosíntesis, el metabolismo, la inmunología, la fisiología y la toxicidad de estas moléculas. También se han estudiado para identificar posibles objetivos e **inhibidores de anticuerpos.**

En plantas, estas moléculas se utilizan para estudiar las **respuestas de defensa**, así como la **promoción del crecimiento** y para descifrar las vías que son activadas durante las interacciones planta-lipopolisacáridos. El análisis de plantas con mutaciones en los componentes de señalización, puede permitir una evaluación de su contribución en la **resistencia a enfermedades de las plantas**, evitando así pérdidas económicas en los cultivos.



Ormeño-Orillo, E. (2005). Lipopolisacáridos de Rhizobiaceae: estructura y biosíntesis. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47(3-4), 165-175. https://www.mediagraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2005/mio5-3_4l.pdf

Renato, M. (2015). El sistema inmunitario de las plantas. *Scilogs. Investigación y Ciencia*. <https://www.in->

vestigacionyciencia.es/blogs/medicina-y-biologia/53/posts/el-sistema-inmunitario-de-las-plantas-12979

Farhana, A. (2021). Biochemistry, Lipopolysaccharidae. *Statpearls content is king*. <https://www.statpearls.com/ArticleLibrary/viewarticle/24323>

7.3.3. Molecular Signals and Elicitors in *Azospirillum*-Plant Interactions.

Molecular Signals and Elicitors in *Azospirillum*-Plant Interactions

Alma Alejandra Hernández-Esquivel, Manuel Méndez-Gómez, Amanda Ortiz-Calderón, Elda Castro-Mercado, Ernesto García-Pineda

A. A. Hernández-Esquivel, A. Ortiz-Calderón, E. Castro-Mercado, E García-Pineda *
Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San
Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México

* egpineda@umich.mx; <https://orcid.org/0000-0002-4739-7741>

M. Méndez-Gómez

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, I.P.N.
Irapuato, Guanajuato, México

Abstract

The interaction between *Azospirillum* and plant roots is complex, involving bacterial-derived molecules whose precise functions remain largely unknown. However, the role of some of these molecules in establishing root associations and stimulating biochemical responses in plant root cells is gradually being uncovered. Bacterial molecules involved in root interaction include structural components of the cell wall and flagellum, such as lipopolysaccharides and flagellin, as well as excreted compounds like exopolysaccharides. These molecules actively promote plant growth and elicit defense responses. Current research suggests that these bacterial molecules, together with phytohormones, work synergistically to enhance the biological activity of *Azospirillum* in plants. Future studies will be essential to elucidate the specific contributions of each component to the beneficial effects of the rhizobacteria on plant health and development.

Keywords: Exopolysaccharides, Lipopolysaccharides, Flagellin, Plant Growth Promotion

10.1 *Azospirillum*-Derived Proteins, Lipids, and Carbohydrates as Root Colonization mediators

Azospirillum bacteria are recognized as colonizers of the root tissue of various plant species, primarily cereals and grasses such as wheat and sorghum. They can attach to different areas of the root, including intercellular spaces of root hairs, the meristematic zone, and the elongation zone, exhibiting species-specific attachment preferences. However, only a few *Azospirillum* strains have been identified with the ability to internalize plant cells (Yegorenkova et al. 2001; Zhu et al. 2002).

Many researchers consider the initial stage of the *Azospirillum*-plant interaction to be influenced by the metabolic state of the bacteria. Through metabolic processes such as motility and chemotaxis, *Azospirillum* can assess its energy levels and migrate toward nutrient-rich niches. These attractants, secreted by plants, guide bacterial movement and correlate with the specificity of the chemotactic response, integrating a signal transduction pathway. This ultimately leads to the attachment and anchoring of the bacteria to the root (Wisniewski-Dyé et al. 2014; Borland et al. 2015).

Several plant-secreted metabolites stimulate metabolic changes in bacteria. Root exudates from various plants, including wheat, maize, bean, and alfalfa, induce protein secretion in *Azospirillum brasilense* Sp7. Notably, a 40-kDa acidic protein is highly induced in response to these exudates. However, its specific role in plant-root interactions remains uncharacterized (Bastelaere et al. 1993). Cell surface and secreted proteins of *Azospirillum* have been poorly studied as potential factors in bacterial interactions with plant roots. Their role as integral components of the bacteria-plant interaction complex or as elicitors of plant responses remains a promising area of research.

Two mechanisms have been proposed for the interaction of *Azospirillum* with plant roots. The first involves a fast and reversible binding mediated by proteins (Michiels et al. 1991). In this context, studies on *Azospirillum brasilense* have shown that a mutant lacking the Tlp1 protein (transducer-like protein 1), a chemoreceptor involved in

bacterial chemotaxis toward organic acids, exhibits deficiencies in wheat root colonization (Greer-Phillips et al. 2004). Similarly, the Tlp2 protein (transducer-like protein 2) plays a role in the efficient colonization of red clover (*Trifolium pratense*) and bean (*Vigna unguiculata*), but not wheat, suggesting that these proteins may regulate host specificity in a selective manner (Ganusova et al. 2024).

Likewise, in *Azospirillum brasilense*, the CheA1 and CheA4 proteins (chemoreceptor-associated histidine kinases) regulate key aspects of bacterial metabolism, including motility based on chemotactic responses to various molecules, recognition of root surface regions, and colonization (Ganusova et al. 2021). Similarly, the SbpA protein (a crystalline bacterial cell surface protein) mediates the chemotactic response to saccharides such as D-fucose, L-arabinose, and D-galactose, facilitating root colonization (Steenhoudt et al. 2000).

Flagellar proteins play a role in root adhesion. Specifically in *Azospirilla*, the Fla1 protein, a component of the polar flagellum, enables bacterial attachment to plant roots (Steenhoudt et al. 2000).

The second mechanism involves strong and irreversible anchoring to the root tissue, mediated by the bacterial production of various extracellular polysaccharides. In this process, polysaccharide-derived microfibrils contribute to the attachment of *Azospirillum* to wheat roots (Michiels et al. 1991). In *Azospirillum brasilense* Sp7, specific polysaccharides constituted by N-acetyl-D-glucosamine, N-acetyl-D-galactosamine, galactose, glucose, and mannose can bind to lectins found in plant roots (Igor et al. 1998). The production of polysaccharides involved in root binding has been reported to be regulated by the *flcA* gene in *Azospirillum* (Steenhoudt et al. 2000). Lectins are glycoproteins that play a crucial role in bacterial aggregation and subsequent root colonization (Wisniewski-Dyé et al. 2013). Wheat germ agglutinin (WGA) can interact with certain *Azospirillum* species due to the presence of N-acetyl-D-glucosamine-containing polysaccharide complexes on the bacterial cell surface. As a result, WGA has been suggested to function as an acceptor in *Azospirillum* root colonization (Yegorenkova et al. 2001; Igor et al. 1998). *Azospirillum brasilense* strains

Sp7, Sp107, Sp245, and S17 produce at least two polysaccharide-containing complexes, which have been shown to bind wheat germ agglutinin. The polysaccharides from all strains contain rhamnose, galacturonic acid, and glucosamine. However, strains Sp7 and S17 also include fucose and mannose, respectively, and both contain galactose. These polysaccharide-containing complexes may contribute to the interaction between *Azospirillum* and wheat root surfaces (Konnova et al. 1994).

Lipopolysaccharides (LPS) are molecules found in the outer membrane of Gram-negative bacteria, including the *Azospirillum* genus. They play a crucial role in plant recognition and subsequent root anchoring, as observed in interactions between *Pseudomonas putida* and potato (Mazgaeen et al. 2020). LPS consist of a lipid component (lipid A) and a glycosidic component (core and O-antigen). In wheat, *Azospirillum* LPS are essential for root hair deformation and colonization. Similarly, *A. brasilense* LPS mutants exhibit reduced colonization due to modifications in their glycosidic structures (Yegorenkova et al. 2001; Jofré et al. 2004). Whether plant roots have receptors for LPS remains unknown. Although receptors, such as LORE (LIPOOLIGOSACCHARIDE-SPECIFIC REDUCED ELICITATION), have been identified in plants, their precise mode of action is still unclear (Shang et al. 2018).

Identifying the molecules from *Azospirillum* involved in the sequential events leading to successful root colonization provided insights into the precise role of each player in the *Azospirillum*-plant root interaction.

10.2 Role of Exopolysaccharides in Root Colonization and Promotion of Plant Growth

Bacterial exopolysaccharides (EPS) are high-molecular-weight carbohydrate polymers. Depending on their location, they can be categorized into two types: capsular polysaccharides (CP), which remain in direct contact with the bacterial cell wall, and exopolysaccharides (EPS), which, though weakly associated with the cell

wall, are excreted (Netrusov et al. 2023). EPS play a vital role in bacterial flocculation, biofilm formation, protection against abiotic stress, and root colonization, particularly in plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) (Netrusov et al. 2023; Pham et al. 2024).

Extracellular polysaccharides play a crucial role in the anchorage of the bacteria to the plant root (Michiels et al. 1991; Viruega-Góngora et al. 2020). Genetic studies using complementation assays of *Sinorhizobium meliloti* mutants with *Azospirillum brasilense* DNA identified several genes involved in EPS biosynthesis, including *exoB* (UDP-glucose 4'-epimerase), *exoC* (phosphomannomutase), *rmlD* (dTDP 4-rhamnose reductase), *phbC* (poly- β -hydroxybutyrate synthase), *noeJ* (mannose-6-phosphate isomerase), and *noeL* (GDP-mannose 4,6-dehydratase) (Jofré et al. 2004; Lerner et al. 2009; Michiels et al. 1988).

Additionally, the Che1 chemotaxis-like pathway, which regulates chemotaxis, also indirectly regulates EPS production (Bible et al. 2012; Cruz-Pérez et al. 2021). Understanding how plant roots stimulate these pathways to influence EPS synthesis would be of significant interest.

Azospirillum EPS are heteropolymers primarily composed of glucose, galactose, fucose, rhamnose, arabinose, and smaller amounts of xylose and allose. However, their composition varies depending on species, strain, growth stage, and environmental conditions (Bahat-Samet et al. 2004; Burdman et al. 2000; Jofré et al. 2004; Lerner et al. 2009; Skvortsov and Ignatov, 1998). Genome sequencing of *Azospirillum* strains has revealed unique genes, suggesting potential differences in EPS biosynthesis pathways, as well as variations in EPS quantity and composition (Borziak et al. 2011; Wisniewski-Dyé et al. 2012). These variations, whether strain-specific or environmentally induced, influence flocculation, biofilm formation, cell aggregation, and, most importantly, root colonization capacity (Burdman et al. 2000; Fischer et al. 2003; Jofré et al. 1998, 2004). For instance, under salt stress, *A. brasilense* Cd produces EPS rich in galactose, whereas under normal conditions, the EPS primarily consists of glucose (Fischer et al. 2003). These compositional shifts correlate with

changes in root colonization efficiency (Jofré et al. 1998). Furthermore, root exudates induce the production of arabinose and xylose in the EPS of *A. brasilense* Cd (Fischer et al. 2003). Since root exudates serve as a key carbon source for bacteria, their composition under normal and stress conditions can stimulate EPS modifications that ultimately influence the colonization process (Chen and Liu 2024; Maruyama et al. 2020).

Although some studies suggest that *Azospirillum* EPS contribute to plant growth promotion under various stress conditions, the molecular mechanisms underlying this process remain largely unknown. Maize plants inoculated with *A. brasilense* Ab-V5, a high-EPS-producing strain, exhibited growth levels comparable to fully fertilized plants despite receiving only 20% of the usual fertilizer (Oliveira et al. 2017). The elevated EPS production appear to enhance bacterial viability, protects inoculants, and boosts plant growth promotion. This is particularly relevant since EPS-deficient *Azospirillum* mutants are more susceptible to stressors such as salinity, high temperature, antibiotics, and hydrogen peroxide (Fischer et al. 2003; Jofré et al. 1998; Lerner et al. 2009). EPS alone have biological activity on plant growth. Sankari et al. (2011) reported that EPS application enhances rice plant growth and protects against *Pyricularia oryzae* infection. They also can contribute to the metal toxicity tolerance of the inoculated plants. *A. brasilense* Az39 has been identified as a potential bioinoculant for arsenic-contaminated soils due to its high EPS and biofilm production in the presence of arsenic (Armendariz et al. 2015). Furthermore, these bacterial components improve the biochemical qualities in plants under abiotic stress. The co-inoculation with *Bacillus subtilis* and *A. brasilense*, both high-EPS producers, improves wheat growth, osmolyte accumulation, antioxidant activity, and hormone synthesis under drought conditions (Ilyas et al. 2020).

However, not all studies support a direct link between EPS overproduction and enhanced plant growth. For example, phenotypic variants of *A. brasilense* Sp7 that produce up to eight times more EPS and exhibit increased resistance to heat and ultraviolet light promote plant growth at levels similar to the parental strain. This

suggests that while EPS overproduction may aid bacterial adaptation to rhizospheric stress, it does not necessarily enhance plant growth further (Volfson et al. 2013).

Despite these findings, further research is needed to elucidate the precise role of EPS in plant-*Azospirillum* interactions. Given their role in stress mitigation, EPS-based biostimulants could be valuable for improving the resilience of economically important crops. However, a deeper understanding of how plants perceive *Azospirillum* EPS and the signaling pathways they trigger is essential for their effective application.

10.3 *Azospirillum* Lipopolysaccharides as Signaling Molecules for Plant Growth Modulation

Signaling molecules and surface components from both plant and bacterial cells play a crucial role in establishing plant-bacterium associations (Sigida et al. 2019). Among these components, lipopolysaccharide (LPS), a major constituent of the Gram-negative bacterial outer membrane, is particularly significant. LPS were discovered in the late 19th century, and initially termed as endotoxin (Knirel and Valvano 2011). Choma et al. (1984) isolated LPS by first time from *A. lipoferum* SpBr17.

In *Azospirillum* cells, LPS constitutes approximately 70% of the cell surface and are considered essential for plant-bacterium interactions (Fedonenko et al. 2008; Fedonenko et al. 2015).

Structurally, LPS are amphiphilic molecules consisting of a hydrophobic lipid A component, which is linked to a core oligosaccharide (core). This core, in turn, is connected to an O-specific polysaccharide (O antigen, O chain, or OPS) composed of repeating oligosaccharide units. The S (Smooth) form of LPS includes all three components (lipid A, the core oligosaccharide, and the O-specific polysaccharide) whereas the R (Rough) form lacks the O-specific polysaccharide and consists only of lipid A and the core oligosaccharide (Sigida et al. 2013).

The analysis of LPS from *A. lipoferum* SpBr17 revealed the neutral sugar and fatty acid composition of the LPS, identifying rhamnose and glucose as the primary components

of the O-side chains, which together accounted for more than 95% of the neutral sugars. Additionally, a high concentration of two distinct 3-hydroxylated fatty acids and the presence of D-glycero-D-mannoheptose were detected, suggesting that the LPS of *A. lipoferum* SpBr17 belongs to the S type (Choma et al. 1984). Shortly afterward, the LPS of ten different *Azospirillum* strains, five from *A. brasilense* and five from *A. lipoferum*, were analyzed. The LPS composition was easily distinguishable between the species, with *A. brasilense* exhibiting a more complex sugar profile, including rhamnose, fucose, galactose, mannose, and glucose in varying proportions (Choma et al. 1987).

The characterization of the O-polysaccharides of LPS from various *Azospirillum* strains (Table 1), revealed a high degree of similarity among them attributed to the presence of repeating structural units in their O-antigens. The serological properties and chemotypes of O-antigens have led to the classification of these strains into three serogroups. Serogroup I is characterized by linear D-rhamnose. These bacteria are widely distributed across different climate zones and are commonly associated with wheat. A representative species of this group is *A. brasilense* Sp245 (Fedonenko et al. 2011). Serogroup II encompasses the largest number of strains and exhibits the greatest diversity in the OPS of their LPS. Classification into this serogroup is based on serological cross-reactions with the type strain *A. brasilense* Sp7 (Konnova et al. 2008; Fedonenko et al. 2015). The host range for Serogroup II *Azospirillum* includes various gramineous plants, such as crabgrass, *Cynodon*, millet, rice, and wheat. Serogroup III is distinguished by the presence of L-rhamnose in the main chain and D-glucose in the side chain. A representative strain of this group is *A. lipoferum* 59b (Sigida et al. 2014). The structure of lipid A in *Azospirillum* has only been reported for *A. lipoferum* SpBr17. Its backbone consists of a β -(1,6)-linked D-glucosamine disaccharide but notably lacks phosphate residues, in contrast to enterobacterial lipid A, which contains phosphate residues and are strongly associated with the endotoxic activity of LPS molecules. This structural difference suggests that *Azospirillum* lipid A may exhibit lower toxicity toward eukaryotic cells (Choma and Komaniecka 2008).

Research on these macromolecules, particularly their chemical structure, is crucial for advancing our molecular-level understanding of the mechanisms that drive effective plant-bacteria symbiosis (Fedonenko et al. 2005). Mutants with impaired LPS biosynthesis show reduced adsorption efficiency to wheat roots and a diminished capacity to colonize maize roots compared to their wild-type counterparts (Fedonenko et al. 2001; Jofré et al. 2004; Fedonenko et al. 2008).

Lipopolysaccharides of plant pathogenic bacteria are classified as microbe-associated molecular patterns (MAMPs), which are recognized by the plant innate immune system. This recognition triggers a range of defense responses, including the production of reactive oxygen species (ROS), nitric oxide (NO), and pathogenesis-related (PR) proteins (Newman et al. 2013). The recognition of MAMPs involves Pattern Recognition Receptors (PRRs), which can be kinase-type receptors featuring an extracellular domain for ligand perception, a transmembrane domain, and an intracellular kinase domain (Boutrot and Zipfel 2017).

Recent studies have focused on elucidating the role of specific LPS components in plant-microbe interactions, with evidence suggesting that the OPS moiety may act as an elicitor, triggering a cascade of plant defense responses (Sigida et al. 2015).

Plants can use MAMP recognition not only to mount immune responses but also to establish beneficial symbiotic relationships and improve plant growth. The application of LPS from *Azospirillum* strains to wheat (*Triticum aestivum*), cucumber (*Cucumis sativus*), potato, and *Arabidopsis* has been shown to induce early growth responses in seedlings. However, to date, no specific receptors for *Azospirillum* LPS have been identified. LPS from *Azospirillum brasilense* Sp245, are also able to activate the mitotic activity of meristematic cells in wheat roots, which was comparable to the whole bacterial cells (Evseeva et al. 2011).

Plant growth parameters such as enhanced leaf elongation, dry weight and spike formation were also improved with the exogenous application of *A. brasilense* Sp245 LPS on wheat. However, they also accelerated plant aging, suggesting that LPS influences developmental processes in wheat (Chávez-Herrera et al. 2018).

However, LPS from Sp245 has been shown to stimulate biochemical responses in wheat and cucumber plants, including the production of reactive oxygen species (ROS) (Vallejo-Ochoa et al. 2017), elevated peroxidase activity, increased Ca^{2+} availability (Hernández-Esquivel et al. 2020), and total phenolic content (Morales-Ascencio et al. 2019).

Interestingly, LPS from *Azospirillum* significantly stimulates morphogenetic activity of wheat somatic tissues in comparison with LPS from *Enterobacteriaceae*, in addition to the increase in plant size and weight (Evseeva et al. 2018). Furthermore, the O-polysaccharide appear to be important in the morphogenetic activity of *Azospirillum* LPS. A comparative study of LPS from three *Azospirillum* strains (*A. brasilense* SR55, *A. brasilense* SR75, and *A. lipoferum* SR65) on calluses derived from two wheat (*Triticum aestivum*) lines (LRht-B1c and LRht-B1a) differing in their morphogenetic activity show that LPS from *A. lipoferum* SR65 significantly promoted callus morphogenesis and regenerative development in both wheat lines. Meanwhile, LPS from *A. brasilense* SR55 and SR75 selectively enhanced either the yield of morphogenetic calluses or the yield of regenerated plants, respectively. Overall, *Azospirillum* LPS had a stronger effect on the weakly morphogenetic LRht-B1a line than on the highly morphogenetic LRht-B1c line (Tkachenko et al. 2021).

The monosaccharide residues of the O-polysaccharide play a main role in the stimulatory effects of LPS on plant growth promotion. In a study analyzing the effects of LPS from six bacterial strains belonging to different taxonomic groups (*Ochrobactrum quorumnogens* T1Kr02, *Pseudomonas chlororaphis* K3, *Azospirillum brasilense* SR80, *Azospirillum brasilense* SR88, *Azospirillum thiophilum* BV-S, and *Azospirillum zeae* N7) on potato microplants, growth parameters such as shoot length, total root length, and dry weight of shoots and roots were evaluated. The LPS from *Ochrobactrum quorumnogens* T1Kr02 and *Azospirillum thiophilum* BV-S exhibited the most significant positive effects. Notably, the O-polysaccharides of these strains consist predominantly or entirely of 6-deoxyhexose residues, specifically fucose and rhamnose (Ivanova et al. 2024).

The molecular mechanism by which LPS influences plant growth remains under investigation. However, the Target of Rapamycin (TOR) signaling pathway has been shown to play a role in the cellular response to LPS. *Arabidopsis thaliana* plants sprayed with two different concentrations of *Azospirillum brasilense* Sp245 LPS (10 and 100 µg/mL) exhibited enhanced growth and development. This effect correlated with increased expression and activity of the TOR kinase, as well as phosphorylation of its downstream target, the S6K protein. These changes also promoted cell proliferation, suggesting that *A. brasilense* LPS may modulate TOR-mediated processes (Méndez-Gómez et al. 2020). While these findings provide valuable insight into the molecular components for LPS activity, many questions remain. The upstream elements that activate this pathway, potential crosstalk with phytohormone signaling, and the precise mechanisms by which plants recognize *Azospirillum* LPS are still unknown. Further research is needed to fully elucidate these complex interactions.

Table 1. Structures of repeating units of OPS from *Azospirillum* spp.

	Strain	Structure of repeating units	Reference
<i>Azospirillum lipoferum</i>	SpBr17	$\rightarrow 3)-2-O-Ac-\alpha-L-Rhap-(1\rightarrow 2)-\alpha-L-Rhap-(1\rightarrow 3)-\alpha-L-Rhap-(1\rightarrow$ $\begin{array}{ccc} & 2 & 3 \\ & O-Ac & \uparrow \\ & & \beta-D-Glcp \\ & & D \end{array}$	Choma et al.,1984 Choma et al.,2009
	Sp59b	$\alpha-L-Rhap-(1\rightarrow 3)-\alpha-L-Rhap-(1\rightarrow 2)-\alpha-L-Rhap-(1\rightarrow 3)-\beta-D-Manp-(1\rightarrow 4)$ $\downarrow$ $\begin{array}{c} 4 \\ \beta-D-Galp \end{array}$ $\rightarrow 3)-\beta-D-Galp-(1\rightarrow 3)-\alpha-D-Galp-(1\rightarrow$	Fedonenko et al.,2005
	Sp59b SR66	$\beta-D-Glcp-(1\rightarrow 3) \left[\begin{array}{c} \\ \rightarrow 2)-\alpha-L-Rhap-(1\rightarrow 3)-\alpha-L-Rhap-(1\rightarrow 3)-\alpha-L-Rhap-(1\rightarrow \end{array} \right.$ $\begin{array}{c} O-Ac \\ 2 \\ \beta-D-Glcp \end{array}$	Smol'kina et al.,2010 Fedonenko et al.,2011
	SR65 SR85	$\beta-D-Glcp-(1\rightarrow 3) \left[\begin{array}{c} \\ \rightarrow 2)-\alpha-L-Rhap-(1\rightarrow 3)-\alpha-L-Rhap-(1\rightarrow 3)-\alpha-L-Rhap-(1\rightarrow \end{array} \right.$	Fedonenko et al.,2008 Fedonenko et al.,2011
	SR5 SR16 SR38 SR61	$\beta-D-Glcp-(1\rightarrow 3) \left[\begin{array}{c} \\ \rightarrow 2)-\alpha-L-Rhap-(1\rightarrow 3)-\alpha-L-Rhap-(1\rightarrow 3)-\alpha-L-Rhap-(1\rightarrow \end{array} \right.$ $\begin{array}{c} 2-O-Ac \\ \\ \beta-D-Glcp \end{array}$	Fedonenko et al.,2015
<i>Azospirillum brasilense</i>	SR75 Sp107 RG20a	$\rightarrow 2)-\beta-D-Rhap-(1\rightarrow 3)-\alpha-D-Rhap-(1\rightarrow 3)-\alpha-D-Rhap-(1\rightarrow 2)-\alpha-D-Rhap-(1\rightarrow 2)-\alpha-D-Rhap-(1\rightarrow$	Fedonenko et al.,2005 Boyko et al.,2010
	S17 S27	$\beta-D-GlcpNAC(1\rightarrow 4) \left[\begin{array}{c} \\ \rightarrow 4)-\alpha-L-Rhap2Me-(1\rightarrow 3)-\alpha-D-ManpN(SHb)-(1\rightarrow \end{array} \right.$ $\beta-D-Glcp-(1\rightarrow 2) \left[\begin{array}{c} \\ \rightarrow 3)-\alpha-L-Rhap-(1\rightarrow 3)-\alpha-L-Rhap-(1\rightarrow 2)-\alpha-L-Rhap-(1\rightarrow \end{array} \right.$	Fedonenko et al.,2008 Fedonenko et al.,2015
	R15	$\rightarrow 2)-\alpha-D-Rhap-(1\rightarrow 2)-\beta-D-Rhap-(1\rightarrow 3)-\alpha-D-Rhap-(1\rightarrow 2)-\alpha-D-Rhap-(1\rightarrow$	Boyko et al.,2010
	54 SR8	$\beta-D-Glcp-(1\rightarrow 4) \left[\begin{array}{c} \\ \rightarrow 3)-\alpha-L-Rhap-(1\rightarrow 3)-\alpha-L-Rhap-(1\rightarrow 2)-\alpha-L-Rhap-(1\rightarrow \end{array} \right.$	Fedonenko et al.,2011 Fedonenko et al.,2015
	R55	$\rightarrow 3)-\beta-L-Rhap-(1\rightarrow 4)-\alpha-L-Rhap-(1\rightarrow 3)-\alpha-D-Galp-(1\rightarrow 3)-\beta-L-Rhap-(1\rightarrow 4)-\beta-L-$ $\begin{array}{c} \alpha-D-GlcpA-(1\rightarrow 2) \\ \\ Rhap3OMe-(1\rightarrow 4)-\alpha-L-Rhap-(1\rightarrow 3)-\alpha-D-Galp-(1\rightarrow \end{array}$	Boyko et al.,2011
	Jm6B2	$\alpha-D-Rhap3OMe-(1\rightarrow 3) \left[\begin{array}{c} \\ \rightarrow 4)-\alpha-L-Fucp-(1\rightarrow 4)-\beta-D-Xylp-(1\rightarrow \end{array} \right.$	Boyko et al.,2012

10.4 Function of Flagellin in the Interaction Between Plants and *Azospirillum*

Azospirillum brasilense is a Gram-negative, nitrogen-fixing rhizobacterium distinguished by a mixed flagellation pattern. It has a single polar flagellum, which facilitates swimming (Tarrand et al. 1978; Zhulin and Armitage 1993), and multiple lateral flagella that enable swarming on solid surfaces (Hall and Krieg 1983).

Motility and chemotaxis allow *A. brasilense* to detect and move toward energy sources. The bacterium exhibits chemotactic responses to various amino acids, organic acids, and sugars (Zhulin and Armitage 1993). Among these, oxalate secreted by rice and malate exuded by maize play crucial roles in determining host specificity during colonization (Reinhold et al. 1985).

The initial stage of root colonization, involving adsorption to plant roots, is facilitated by the polar flagellum (Croes et al. 1993). This structure is critical for early colonization, as mutants lacking both polar and lateral flagella show significantly reduced adsorption capacity (Tarrand et al. 1978; Croes et al. 1993). Supporting this, studies have demonstrated that purified polar flagella effectively bind to wheat roots, whereas lateral flagella do not exhibit this binding ability (Croes et al. 1993).

Flagellin, the primary structural protein of the bacterial flagellum filament, is one of the most abundant and widely distributed proteins in motile bacteria (Chaban et al. 2015). The flagellar filament, a tubular structure extending up to 15 μm in length, is assembled through the distal polymerization of up to 30,000 flagellin (FliC) subunits (Paradis et al. 2017).

The N- and C-terminal regions of flagellin, each approximately 250 amino acids long, fold together to form the D0 and D1 structural domains. Located at the filament core, these domains are essential for polymerization (Yonekura et al. 2003). Despite the structural constraints that require conservation of the terminal sequences, the central region of flagellin—the hypervariable domain—exhibits significant variation in length and is exposed on the filament surface (Beatson et al. 2006).

The role of flagellins from plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in triggering plant responses remains largely unexplored (Sumayo et al. 2013), though progress has been made in their characterization. Glycosylation of the flagellin in the polar flagellum was first identified in *Azospirillum brasilense* type strain Sp7 (Moens et al. 1995). Subsequent studies confirmed the presence of an O-linked polysaccharide in the glycosylated flagellin of Sp7 and characterized the structure of its tetrasaccharide repeating unit (Belyakov et al. 2012). More recently, research has shown that flagellin glycosylation is widespread among Gram-negative bacteria, influencing filament assembly, molecular recognition, and interactions with various partners (Merino and Tomás 2014). However, the biological significance of flagellin glycosylation in plant-bacteria interactions remains unknown.

Flagellin has been extensively studied in the context of plant-pathogen interactions. In tomato and *Arabidopsis* cell cultures, both intact flagellin and its fragments from the phytopathogen *Pseudomonas syringae* can trigger plant immune responses (Felix et al. 1999; Boller and Felix 2009; Gómez-Gómez and Boller 2002). Research has identified a conserved 22-amino acid peptide, Flg22, within the flagellin protein of *Pseudomonas aeruginosa*, as the key elicitor responsible for these immune responses. Flg22 activates defense mechanisms in aerial plant tissues, including reactive oxygen species (ROS) bursts, ethylene production, and alkalinization responses (Felix et al. 1999; Wyrsh et al. 2015). It is the most extensively studied pathogen-associated molecular pattern (PAMP) (Jin et al. 2022) and microbe-associated molecular pattern (MAMP) (Aslam et al. 2009).

Flg22 is embedded within the bacterial flagellum and must first be modified by plant-secreted glycosidases, such as BGAL1, to initiate immune responses. These enzymes hydrolyze the glycosyl groups of flagellin proteins and are induced under conditions of hypoxia, salt stress, and pathogen attack (Schmid et al. 2005). Subsequently, plant-secreted proteinases cleave flagellin to release Flg22 in its biologically active form (Sanguankiatichai et al. 2022).

Whether a similar mechanism exists for generating Flg22 during interactions between beneficial bacteria and plants remains unknown and warrants further investigation. To date, no studies have reported the biological activity of *Azospirillum* Flg22 in plants. It remains unclear whether this peptide plays a role in the plant growth-promoting effects of *Azospirillum* or whether plants associated with *Azospirillum* possess specific receptors for its Flg22.

Interestingly, the *Xa21* resistance gene in rice, which confers gene-for-gene resistance against *Xanthomonas oryzae*, encodes a protein with a structure and sequence similar to the FLS2 protein. FLS2 is a receptor-like kinase (RLK) composed of an extracellular leucine-rich-repeat (LRR) domain, a single membrane-spanning domain, and an intracellular serine/threonine protein kinase domain (Gómez-Gómez and Boller 2000; Shiu and Bleecker 2001; Song et al. 1995). The LRR domain is a common structural motif in extracellular proteins, including members of the Toll-receptor family (Kopp and Medzhitov 1999). These domains are believed to mediate interactions with ligands, particularly with other proteins or peptides (Kobe and Deisenhofer 1995). This suggests that the LRR domain of FLS2 may serve as a receptor for flg22 and flagellin (Gómez-Gómez and Boller 2000).

In Solanaceous plants such as tomato, potato, and pepper, an additional FLS receptor (FLS3) has been identified, which recognizes a different epitope of *Pseudomonas* flagellin (Hind et al. 2016). This finding indicates that the same molecule, flagellin, can be detected by different plant receptors. Whether FLS receptors perceive flagellin from pathogenic and beneficial bacteria in the same manner remains an open question.

Although the flagellum plays a key role in the adsorption of *A. brasilense* to plant roots (Croes et al. 1993), the specific contributions of flagellin and lipopolysaccharides (LPS) in this process remain unclear. Notably, LPS appears to form a sheath around the flagellar filament (Burygin et al. 2007), which may influence its interaction with plant surfaces.

Moens et al. (1995) demonstrated that the flagellin of the polar flagellum in *A. brasilense* Sp7 is glycosylated, while Belyakov et al. (2012) further characterized these

glycan chains as a polysaccharide with a branched tetrasaccharide repeating unit composed of rhamnose (Rha), fucose (Fuc), galactose (Gal), and *N*-acetylglucosamine (GlcNAc). Notably, this tetrasaccharide shares the same monosaccharide residue ratio as the O-specific polysaccharide chain of the lipopolysaccharide (LPS) from the same strain, highlighting a close structural relationship between these two glycopolymers.

Flagellin glycosylation may influence the interaction of *Azospirillum* with plant hosts. While direct studies on *Azospirillum* flagellin glycosylation and immune evasion remain limited, research on other bacteria suggests that glycosylation enhances the structural stability of flagella, potentially reducing the release of flagellin monomers and, consequently, minimizing recognition by plant immune receptors (Rossez et al. 2015). This raises the possibility that a key distinction between plant-beneficial and pathogenic bacteria in plant recognition and defense activation could lie in flagellin glycosylation.

Beyond its structural role, the flagellin of *A. brasilense* Sp245 functions as an elicitor of molecular changes associated with plant growth promotion. Remarkably, it can independently stimulate mitosis in wheat roots (Shirokov et al. 2020), demonstrating that bacterial structural components play a crucial role in activating plant growth responses. These effects, combined with bacterial phytohormone production, contribute to the mechanisms by which plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) enhance plant development.

Additionally, *Azospirillum* flagellin (from *A. brasilense* REC3) has been shown to act as a microbe-associated molecular pattern (MAMP), triggering plant defense responses. These include reactive oxygen species (ROS) accumulation, salicylic acid production, callose and lignin deposition, increased biofilm formation on leaves, and stomatal closure, ultimately providing strawberry plants with protection against the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Elías et al. 2022). This property of flagellin suggests that it may play a role in activating plant responses involved in *Azospirillum*-mediated biological control.

Golden Protocol

***In vitro* Assay of *Arabidopsis* Biostimulation by Lipopolysaccharides from *Azospirillum brasilense* Sp245**

Description

Lipopolysaccharide (LPS) is a key component of the outer membrane of *Azospirillum*. Structurally, LPS consists of three distinct regions: lipid A, which anchors it to the bacterial membrane; a core oligosaccharide; and repeating O-antigen units that extend outward from the cell surface. Lipid A, characterized by multiple fatty acids, plays a crucial role in embedding LPS within the membrane. Here, we describe an *in vitro* bioassay to evaluate the biostimulatory effects of *Azospirillum*-derived LPS on *Arabidopsis* plants.

Lipopolysaccharides extraction

Materials

Equipment

1. Plant growth chamber
2. Refrigerator
3. Autoclave
4. Bacteriological incubator
5. Laminar flow hood
6. IEC Centra CL2 centrifuge
7. Eppendorf centrifuge

7. Magnetic stirrer

Procedure

Bacterial Growth

1. **Pre-inoculum:** In a glass tube, add **3 mL of LB minimum (LBm) medium**. Inoculate with a colony of *Azospirillum brasilense* Sp245.
2. Incubate at **30°C** with constant agitation for **16 hours**. Include a negative control (a glass tube containing only LBm, without bacterial inoculation).
3. In an **Erlenmeyer flask**, add **200 mL of LBm**, then inoculate with **300 µL of the pre-inoculum**.
4. Incubate at **30°C** with constant agitation for **24 hours**. Include a negative control (an Erlenmeyer flask containing only **100 mL of LBm**, without pre-inoculum). Ensure that the $OD_{600\text{ nm}} \geq 0.9$.
5. Distribute the culture into **four 50 mL Falcon tubes** (50 mL per tube).
6. Centrifuge at **3,200 rpm** for **10 minutes** (using IEC Centra CL2 centrifuge).
7. Remove **40 mL of the supernatant** from each tube, leaving **10 mL of culture medium** in each. Resuspend the bacterial pellet using a vortex mixer.
8. Combine the resuspended pellets into **a single Falcon tube** (total volume: **40 mL**).
9. Centrifuge again at **3,200 rpm** for **5 minutes**.
 - Ensure proper counterbalancing by using another Falcon tube filled with an equal weight of water.
 - **Optional:** To determine the weight of the cell pellet, weigh the Falcon tube before and after centrifugation, calculating the difference.

10. Resuspend the pellet in **5 mL of sterile distilled water** using a vortex mixer.
11. Add **5 mL of** ice-cold Tris-saturated **phenol** and mix thoroughly.
12. Incubate at **65°C for 20 minutes**.
13. Store at **4°C overnight**.
14. Centrifuge at **3,800 rpm for 10 minutes** (using a CL central centrifuge).
15. Transfer the aqueous phase into a **dialysis membrane**, sealing the bottom with a cotton thread.
 - **Tip:** Before adding the sample, test the dialysis membrane by filling it with sterile distilled water to ensure it is securely sealed.
16. Seal both ends of the dialysis membrane (forming a "candy" shape) and place it in a **beaker containing sterile distilled water**.
17. Dialyze for **3–4 days**, replacing the sterile distilled water every **24 hours** to remove phenol traces.
 - The resulting liquid is referred to as the "**dialysate**."
18. Transfer the dialysate into **Eppendorf tubes**.
19. Centrifuge at **12,000 rpm for 10 minutes** (using an Eppendorf centrifuge).
20. Weigh sterile Eppendorf tubes before use.
21. Transfer the aqueous phase into a **pre-weighed Eppendorf tube**.
22. Add **0.15 M sodium acetate (pH 8.0)** to the dialysate.
23. Add **absolute ethanol in a 1:4 ratio (v/v)**.

- 24. Incubate at -20°C for 24 hours.**
- 25. Centrifuge at 4,200 rpm for 20 minutes.**
- 26. Remove the supernatant and air-dry the pellet at room temperature for 20 minutes.**
- 27. Resuspend the pellet in 200 μL of sterile distilled water and transfer it to a pre-weighed Eppendorf tube. Ensure complete dissolution by pipetting.**
- 28. Add 5 μL of DNase I and 5 μL of RNase from a 10 mg/mL stock solution (final concentration: 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Incubate at 37°C for 30 minutes.**
- 29. Add 10 μL of Proteinase K from a 10 mg/mL stock solution (final concentration: 0.50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Incubate at 59°C for 1 hour.**
- 30. Precipitate the lipopolysaccharides (LPS) by adding ethanol in a 3:1 ratio (v/v). Store at -20°C overnight.**
- 31. Centrifuge at 4,200 rpm for 20 minutes and remove the supernatant.**
- 32. Weigh the tube containing the dried pellet to calculate the LPS yield by subtracting the pre-weighed tube mass.**
- 33. Resuspend the LPS pellet in sterile distilled water.**
- 34. Store at 4°C until use.**

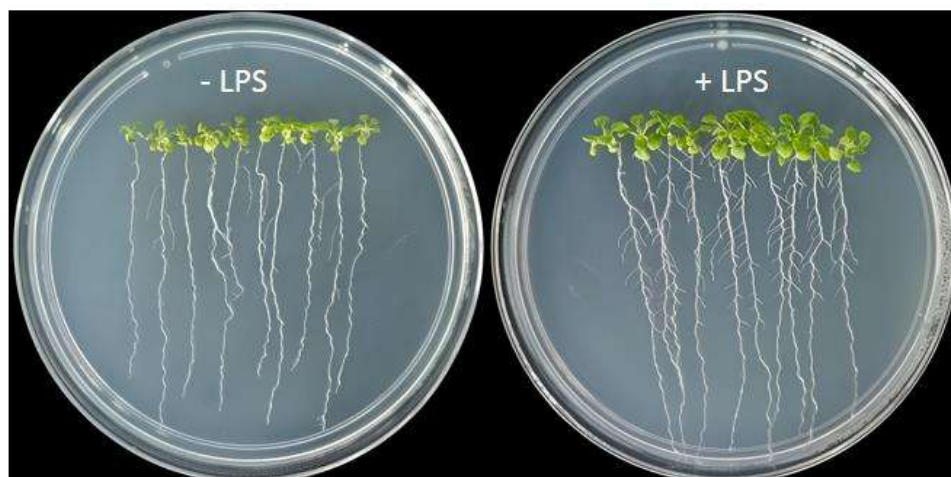
References

1. 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.

2. Nguyen MP, Tran LVH, Namgoong H, et al (2019) Applications of different solvents and conditions for differential extraction of lipopolysaccharide in Gram-negative bacteria. J Microbiol 57:644-654. [http://doi.org/ 10.1007/s12275-019-9116-5](http://doi.org/10.1007/s12275-019-9116-5)

***In vitro* bioassay**

1. Wash and disinfect *Arabidopsis thaliana* seeds as follows:
 - Add 96% (v/v) ethanol for 5 minutes.
 - Remove the ethanol and add 20% (v/v) chlorine for 5 minutes.
 - Remove the chlorine and wash the seeds five times with sterile deionized water, each wash lasting 2 minutes.
2. Store the washed seeds at 4°C for 48 hours.
3. Germinate the seeds on Petri dishes containing 0.2X MS medium for 4 days until they reach approximately 1 cm in length.
4. Prepare 0.2X MS culture medium, sterilize it, and allow it to cool to a warm temperature. Add lipopolysaccharides to a final concentration of 100 µg/mL.
5. Pour the prepared culture medium into Petri dishes and allow it to solidify.
6. Using 1,000 µL pipette tips, transfer 4-day-old germinated seedlings to the Petri dishes containing MS culture medium with lipopolysaccharides, ensuring a 5 mm spacing between plants. Place 10 plants per Petri dish.
7. Seal the Petri dishes with Parafilm and place them horizontally at a 65° angle in a plant growth chamber for 7 days or the duration required for the experiment.



Arabidopsis seedlings grown for ten days in the presence of *Azospirillum brasilense* Sp245 LPS (100 µg/mL) (Image courtesy of Eusebio Álvarez-Santamaría).

References

Armendariz AL, Talano MA, Wevar Oller AL, Medina MI, Agostini E (2015) Effect of arsenic on tolerance mechanisms of two plant growth-promoting bacteria used as biological inoculants. J Environ Sci 33:203–210. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.12.024>

Aslam SN, Erbs G, Morrissey KL et al (2009) Microbe-associated molecular pattern (MAMP) signatures, synergy, size and charge: influences on perception or mobility and host defence responses. Mol Plant Pathol 10:375–387

Bahat-Samet E, Castro-Sowinski S, Okon Y (2004) Arabinose content of extracellular polysaccharide plays a role in cell aggregation of *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol Lett 237:195–203. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.06.036>

Beatson SA, Minamino T, Pallen MJ (2006) Variation in bacterial flagellins: from sequence to structure. Trends Microbiol 14:151–155. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.02.008>

Belyakov AY, Burygin GL, Arbatsky NP et al (2012) Identification of an O-linked repetitive glycan chain of the polar flagellum flagellin of *Azospirillum brasilense* Sp7. Carbohydr Res 361:127–132. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.08.019>

Bible A, Russell MH, Alexandre G (2012) The *Azospirillum brasilense* Che1 chemotaxis pathway controls swimming velocity, which affects transient cell-to-cell clumping. J Bacteriol 194:3343–3355. <https://doi.org/10.1128/JB.00310-12>

Boiko AS, Smol'kina ON, Fedonenko Y et al (2010) O-polysaccharide structure in serogroup I azospirilla. Microbiol 79:197–205. <https://doi.org/10.1134/S0026261710020116>

Boller T, Felix G (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. Annu Rev Plant Biol 60:379–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346>

Borland S, Oudart A, Prigent-Combaret C et al (2015) Genome-wide survey of two-component signal transduction systems in the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum*. BMC Genomics. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1962-x>

Borziak K, Khalsa-moyers G, Alexandre G et al (2011) *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments. PLoS Genet. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002430>

Boutrot A, Zipfel C (2017) Function, discovery, and exploitation of plant pattern recognition receptors for broad-spectrum disease resistance. Annu Rev Phytopathol 55:257–286. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120106>.

Boyko AS, Dmitrenok AS, Fedonenko YP et al (2012) Structural analysis of the O-polysaccharide of the lipopolysaccharide from *Azospirillum brasilense* Jm6B2 containing 3-O-methyl-D-rhamnose (D-acofriose). Carbohydr Res 355:92-5. [https://doi: 10.1016/j.carres.2012.04.006](https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.04.006).

Boyko AS, Konnova SA, Fedonenko YP et al (2011) Structural and functional peculiarities of the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* SR55, isolated from the roots of *Triticum durum*. Microbiol Res 166:585-93. [https://doi: 10.1016/j.micres.2011.01.002](https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.01.002).

Burdman S, Jurkevitch E, Soria-Díaz ME et al (2000) Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation. FEMS Microbiol Lett 189:259–264. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09240.x>

Burygin GL, Shirokov AA, Shelud'ko AV (2007) Detection of a sheath on *Azospirillum brasilense* polar flagellum. Microbiol 76:728–734. <https://doi.org/10.1134/S0026261707060124>

Chaban B, Hughes HV, Beeby M (2015) The flagellum in bacterial pathogens: for motility and a whole lot more. Semin Cell Dev Biol 46, 91–103. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.10.032>

Chávez-Herrera E, Hernández-Esquivel AA, Castro-Mercado E et al (2018) Effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharides on wheat plant development. J Plant Growth Regul 37:859-866. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9782-2>.

Chen L, Liu Y (2024) The function of root exudates in the root colonization by beneficial soil rhizobacteria. Biology. <https://doi.org/10.3390/biology13020095>

Choma A, Komaniecka I (2008) Characterization of a novel lipid A structure isolated from *Azospirillum lipoferum* lipopolysaccharide. Carbohydr Res 343:799–804. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.01.006>.

Choma A, Komaniecka I, Sowinski P (2009) Revised structure of the repeating unit of the O-specific polysaccharide from *Azospirillum lipoferum* strain SpBr17. Carbohydr Res 344:936–939. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.02.021>.

Choma A, Russa R, Lorkiewicz Z (1984) Chemical composition of lipopolysaccharide from *Azospirillum lipoferum*. Microbiol Lett 22:245–248. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1984.tb00735.x>.

Choma A, Russa R, Meyer H et al (1987) Chemical analysis of *Azospirillum* lipopolysaccharides. Arch Microbiol 146:341 – 345.

Croes C L, Moens S, van Bastelaere E et al (1993) The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. J Gen Microbiol 139:2261–2269 <https://doi.org/10.1099/00221287-139-9-2261>

Cruz-Pérez JF, Lara-Ouelhe R, Marcos-Jiménez C et al (2021). Expression and function of the *cdgD* gene, encoding a CHASE–PAS–DGC–EAL domain protein, in *Azospirillum brasilense*. Scientific Rep. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80125-3>

Elías JM, Ramírez-Mata A, Albornóz PL et al (2002) The polar flagellin of *Azospirillum brasilense* REC3 induces a defense response in strawberry plants against the fungus *Macrophomina phaseolina*. J Plant Growth Regul 41:2992–3008. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10490-4>

Evseeva NV, Matora LY, Burygin GL et al (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>.

Evseeva NV, Tkachenko OV, Burygin GL et al (2018) Effect of bacterial lipopolysaccharides on morphogenetic activity in wheat somatic calluses. World J Microbiol Biotechnol. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2386-3>.

Fedonenko YP, Egorenkova IV, Konnova SA et al (2001) Involvement of the lipopolysaccharides of *Azospirilla* in the interaction with wheat seedling roots. Microbiol 70:329–334. <https://doi.org/10.1023/A:1010411629428>.

Fedonenko YP, Zatonsky GV, Konnova SA et al (2002) Structure of the O-specific polysaccharide of the lipopolysaccharide of *azospirillum brasilense* Sp245. Carbohydr Res 337:9869–872. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(02\)00061-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00061-7).

Fedonenko P, Konnova ON, Zatonsky GV et al (2004) Structure of the O-polysaccharide of the lipopolysaccharide of *Azospirillum irakense* KBC1. Carbohydr. Res. 339:1813–1816. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.05.013>.

Fedonenko YP, Borisov IV, Konnova ON et al (2005) Determination of the structure of the repeated unit of the *Azospirillum brasilense* SR75 O-specific polysaccharide and homology of the lps loci in the plasmids of *Azospirillum brasilense* strains SR75 and Sp245. Microbiol 74:542–548. <https://doi.org/10.1007/s11021-005-0101-0>.

Fedonenko P, Konnova ON, Zdrovenko EL et al (2008) Structural analysis of the O-polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* S17. Carbohydr Res 343:810–816. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.12.013>.

Fedonenko P, Zdrovenko EL, Konnova SA et al (2008) Structural analysis of the O-antigen of the lipopolysaccharide from *Azospirillum lipoferum* SR65. Carbohydr Res 343: 2841–2844.

Fedonenko P, Boiko AS, Zdrovenko EL et al (2011) Structural peculiarities of the O-specific polysaccharides of *Azospirillum* bacteria of serogroup III. Biochem (Mosc) 76:797-802. [https://doi.org/ 10.1134/S0006297911070108](https://doi.org/10.1134/S0006297911070108).

Fedonenko P, Burygin GL, Popova IA et al (2013) Immunochemical characterization of the capsular polysaccharide of *Azospirillum irakense* KBC1. Curr Microbiol 67:234–239. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0346-1>.

Fedonenko YP, Sigida EN, Konnova SA et al (2015) Structure and serology of O-antigens of nitrogen-fixing rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. Russ Chem Bull 64:1024–1031. <https://doi.org/10.1007/s11172-015-0971-x>.

Felix G, Duran J, Volko S (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin, Plant J. 18:265-276

Fischer SE, Miguel MJ, Mori GB (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. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)01194-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)01194-1)

Ganusova EE, Vo LT, Abraham PE et al (2021) The *Azospirillum brasilense* core chemotaxis proteins CheA1 and CheA4 link chemotaxis signaling with nitrogen metabolism. mSystems. <https://doi.org/10.1128/mSystems.01354-20>

Ganusova EE, Russell MH, Patel S, Seats T, Alexandre G (2024) An *Azospirillum brasilense* chemoreceptor that mediates nitrate chemotaxis has conditional roles in the colonization of plant roots. Appl Environ Microbiol. <https://doi.org/10.1128/aem.00760-24>

Gómez-Gómez L, Boller T (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. Mol Cell 5:1003–1011

Greer-Phillips SE, Stephens BB, Alexandre G (2004) An energy taxis transducer promotes root colonization by *Azospirillum brasilense*. J Bacteriol 186:6595–6604. <https://doi.org/10.1128/JB.186.19.6595-6604.2004>

Hall PG, Krieg NR (1983) Swarming of *Azospirillum brasilense* on solid media. Can J Microbiol 29:1592-1594

Hernández-Esquivel AA, Castro-Mercado E, García-Pineda E (2020) Comparative effects of *Azospirillum brasilense* Sp245 and *Pseudomonas aeruginosa* PA01 lipopolysaccharides on wheat seedling growth and peroxidase activity. J Plant Growth Reg 40:1903-1911. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10241-x>.

Hernández-Esquivel AA, Castro-Mercado E, Valencia-Cantero E et al (2020) Application of *Azospirillum brasilense* lipopolysaccharides to promote early Wheat plant growth and analysis of related biochemical responses. Front Sust Food Syst. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.579976>.

Hind S, Strickler S, Boyle P et al (2016) Tomato receptor FLAGELLIN-SENSING 3 binds flgII-28 and activates the plant immune system. Nature Plants. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.128>

Ilyas N, Mumtaz K, Akhtar N et al (2020). Exopolysaccharides producing bacteria for the amelioration of drought stress in wheat. Sustainability. <https://doi.org/10.3390/su12218876>

Ivanova MF, Kostina EE, Filip'echeva YA et al (2024) Impact of lipopolysaccharides from rhizospheric bacteria on the growth of potato microplants under vitro conditions. Ann Agrar Sci 3:23–28. <http://dx.doi.org/10.28983/asj.y2024i3pp23-28>.

Jin Y, Tuang ZK, Wang Y et al (2022) Potential roles for pattern molecule of PAMP-triggered immunity in improving crop cold tolerance. Plant Cell Rep 41:337–345

Jofré E, Fischer S, Rivarola V (1998). Saline stress affects the attachment of *Azospirillum brasilense* Cd to maize and wheat roots. Can J Microbiol 44:416-422. <https://doi.org/10.1139/w98-024>

Jofré E, Lagares A, Mori G (2004) Disruption of dTDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolysaccharide core, exopolysaccharide production, and root colonization in *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol Lett 231:267–275. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(04\)00003-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(04)00003-5)

Jofré E, Lagares A, Mori G (2004) Disruption of dTDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolysaccharide core, exopolysaccharide production, and root colonization in *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol Lett 231:267–275. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(04\)00003-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(04)00003-5).

Knirel YA, Valvano MA (2011) Bacterial lipopolysaccharides: Structure, chemical synthesis, biogenesis and interaction with host cell. Springer Wien New York. ISBN 978-3-7091-0732-4 e-ISBN 978-3-7091-0733-1 <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0733-1>.

Kobe B, Deisenhofer J (1995) A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature* 374:183–186

Konnova ON, Boiko AS, Burygin GL (2008) Chemical and serological studies of liposaccharides of bacteria of the genus *Azospirillum*. *Mikrobiologiya* 77:350-7. <https://doi.org/10.1134/S0026261708030090>.

[Konnova SA](#), [Makarov OE](#), [Skvortsov IM et al \(1994\)](#) Isolation, fractionation and some properties of polysaccharides produced in a bound form by *Azospirillum brasilense* and their possible involvement in *Azospirillum*-wheat root interactions. *FEMS Microbiol Lett* 118:93-100. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb06809.x>

Kopp EB, Medzhitov R (1999) The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 11:13–18

Lerner A, Castro-Sowinski S, Valverde A et al (2009) The *Azospirillum brasilense* Sp7 noeJ and noeL genes are involved in extracellular polysaccharide biosynthesis. *Microbiol* 155:4058–4068. <https://doi.org/10.1099/mic.0.031807-0>

Maruyama K, Urano K, Kusano M et al (2020) Metabolite/phytohormone–gene regulatory networks in soybean organs under dehydration conditions revealed by integration analysis. *Plant J* 103:197–211. <https://doi.org/10.1111/tpj.14719>

Mazgaeen L, Gurung P (2020) Recent advances in lipopolysaccharide recognition systems. *Int J M Sci*. <https://doi.org/10.3390/ijms21020379>

Méndez-Gómez M, Castro-Mercado E, Peña-Urbe CA et al (2020) *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharides induce target of rapamycin signaling and growth in *Arabidopsis thaliana*. J Plant Physiol. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153270>.

Michiels KW, Croes CL, Vanderleyden J. (1991). Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. J Gen Microbiol 137:2241-2247. <https://doi.org/10.1099/00221287-137-9-2241>

Michiels KW, Vanderleyden J, Van Gool AP et al (1988) Isolation and characterization of *Azospirillum brasilense* loci that correct *Rhizobium meliloti* exoB and exoC mutations. J Bacteriol. <https://journals.asm.org/journal/jb>

Moens S, Michiels K, Vanderleyden J (1995) Glycosylation of the flagellin of the polar flagellum of *Azospirillum brasilense*, a Gram-negative nitrogen-fixing bacterium. Microbiol 141:2651–2657. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-10-2651>

Morales-Ascencio C, Castro-Mercado E, García-Pineda E (2019) Effect of lipopolysaccharides from *Azospirillum brasilense* on the growth of cucumber plants. Ciencia Nicolaita 78:75–86. <https://doi.org/10.35830/cn.vi78.469>.

Naseem H, Ahsan M, Shahid MA et al (2018) Exopolysaccharides producing rhizobacteria and their role in plant growth and drought tolerance. J Bas Microbiol 58:1009–1022. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800309>

Netrusov AI, Liyaskina EV, Kurgaeva IV et al (2023). Exopolysaccharides producing bacteria: A Review. Microorganisms. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061541>

Newman MA, Sundelin T, Nielsen JT (2013) MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Front Plant Sci.* 4:139. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00139>.

Oliveira ALM, Santos OJAP, Marcelino PRF et al (2017) Maize inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5 cells enriched with exopolysaccharides and polyhydroxybutyrate results in high productivity under Low N fertilizer input. *Front Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01873>

[Paradis G](#), [Chevance FFV](#), [Liou W](#) et al (2017) Variability in bacterial flagella re-growth patterns after breakage. *Sci Rep.* <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01302-5>.

Paul S, Parvez SS, Goswami A et al (2024) Exopolysaccharides from agriculturally important microorganisms: Conferring soil nutrient status and plant health. *Inter J Biol Macromol.* <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129954>

Pham TT, Nguyen TD, Nguyen TT et al (2024) Rhizosphere bacterial exopolysaccharides: composition, biosynthesis, and their potential applications. *Arch Microbiol.* <https://doi.org/10.1007/s00203-024-04113-1>

Rossez Y, Wolfson EB, Holmes A (2015) Bacterial flagella: twist and stick, or dodge across the kingdoms. *PLoS Pathog.* <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004483>.

Sanguankiatichai N, Buscaill P, Preston GM (2022) How bacteria overcome flagellin pattern recognition in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 67:102224

Sankari JU, Dinakar S, Sekar C (2011) Dual effect of *Azospirillum* exopolysaccharides (EPS) on the enhancement of plant growth and biocontrol of blast (*Pyricularia oryzae*) disease in upland rice (var. ASD-19). *J Phytol* 3:16-19.

Schmid M, Davison TS, Henz SR et al (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. Nature Gen 37:501–506

Shang-Guan K, Wang M, Htwe NMPS et al (2018) Lipopolysaccharides trigger two successive bursts of reactive oxygen species at distinct cellular locations. Plant Physiol 176:2543–2556. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01637>

Shirokov A, Budanova A, Burygin G et al (2020) Flagellin of polar flagellum from *Azospirillum brasilense* Sp245: Isolation, structure, and biological activity. Int J Biol Macromol 147:1221-1227. <http://doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.092>

Shiu S-H, Bleecker AB (2001) Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. Proc Natl Acad Sci USA 98:10763–10768

Sigida EN, Fedonenko YP, Shashkov AS et al (2013) Structural studies of the O-specific polysaccharide(s) from the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* type strain Sp7. Carbohydr Res 380:76-80 <https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.07.013>

Sigida EN, Fedonenko YP, Zdrovenko EL et al (2013) Structure of repeating units of a polysaccharide(s) from the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* SR80. Carbohydr Res 371:40-44 <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2013.01.005>.

Sigida EN, Fedonenko YP, Shashkov AS (2018) Structure of the O-specific polysaccharide from *Azospirillum fermentarium* CC-LY743. Carbohydr Res 465:40-43. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2018.06.003>.

Sigida EN, Fedonenko YP, Shashkov AS et al (2019) Structure of the O-specific polysaccharide of *Azospirillum doebereinae* type strain GSF71^T. Carbohydr Res 478:54-57. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.04.009>.

Sigida EN, Fedonenko YP, Zdrovenko EL et al (2014) Characterization of the Lipopolysaccharides of Serogroup II *Azospirillum* strains. Microbiol 83:326–334. <https://doi.org/10.1134/S0026261714040158>.

Sigida EN, Fedonenko YP, Shashkov AS et al (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.

Sigida EN, Grinev VS, Kokoulin MS et al (2024) Structural and genetic relationship of the O-antigens of the type strains *Azospirillum agricola* CC-HIH038 and *Azospirillum doebereinae* GSF71. Microbiol 93:855–863. <https://doi.org/10.1134/S0026261724606948>.

Sigida EN, Grinev VS, Zdrovenko EL et al (2022) O-Antigens of *Azospirillum zeae* N7(T), *Azospirillum melinis* TMCY 0552(T), and *Azospirillum palustre* B2(T): Structure elucidation and analysis of biosynthesis genes. Russ J Bioorg Chem 48:519–528. <https://doi.org/10.1134/S1068162022030177>.

Sigida EN, Shashkov AS, Zdrovenko EL et al (2020) Structure of the O-specific polysaccharide from *Azospirillum formosense* CC-Nfb-7(T). Carbohydr Res. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108060>.

Sigida EN, Fedonenko YP, Shashkov AS et al (2015) Structure of the polysaccharides from the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* Jm125A2. Carbohydr Res 416:37-40 <https://doi.org/10.1016/j.carres.2015.08.011>.

Skvortsov IM, Ignatov VV (1998) Extracellular polysaccharides and polysaccharide-containing biopolymers from *Azospirillum* species: properties and the possible role in interaction with plant roots. FEMS Microbiol Lett 165:223–229. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13150.x>

Smol'kina ON, Kachala VV, Fedonenko YP et al (2010) Capsular polysaccharide of the bacterium *Azospirillum lipoferum* Sp59b: structure and antigenic specificity. Biochem (Mosc). 75:606-13. <https://doi.org/10.1134/s000629791005010x>.

Song WY Wang GL, Chen LL, et al (1995) A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. Science 270:1804–1806

Steenhoudt O, Vanderleyden J (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiol Rev 24:487–506. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00552.x>

Sumayo M, Hahm MS, Ghim SY (2013) Determinants of plant growth-promoting *Ochrobactrum lupini* KUDC1013 involved in induction of systemic resistance against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in tobacco leaves. Plant Pathol J 29:174-181. <https://doi.org/10.5423/PPJ.SI.09.2012.0143>

Tarrand JJ, Krieg NR, Dobereiner 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. Can J Microbiol 24:967-980

Tkachenko OV, Burygin GL, Evseeva NV et al (2021) Morphogenesis of wheat calluses treated with *Azospirillum* lipopolysaccharides. Plant Cell Tiss Organ Cult 147:147-155. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02114-2>.

Vallejo-Ochoa J, López-Marmolejo M, Hernández-Esquivel AA et al (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 Bastelaere E, De Mot R, Michiels K et al \(1993\)](#) Differential gene expression in *Azospirillum* spp. by plant root exudates: Analysis of protein profiles by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. FEMS Microbiol Lett 112:335-342. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb06472.x>

Viruega-Góngora VI, Acatitla-Jácome IS, Reyes-Carmona SR et al (2020). Spatio-temporal formation of biofilms and extracellular matrix analysis in *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol Lett. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa037>

Volfson V, Fibach-Paldi S, Paulucci NS et al (2013) Phenotypic variation in *Azospirillum brasilense* Sp7 does not influence plant growth promotion effects. Soil Biol Biochem 67:255–262. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.09.008>

Wisniewski-Dyé F, Drogue B, Prigent-Combaret C (2013) *Azospirillum*-plant interaction: from root colonization to plant growth promotion. [Beneficial Plant-microbial Interactions](#), 1st Edition, CRC Press.

Wisniewski-Dyé F, Lozano L, Acosta-Cruz E et al (2012) Genome sequence of *Azospirillum brasilense* CBG497 and comparative analyses of *Azospirillum* core and

accessory genomes provide insight into niche adaptation. *Genes* 3:576–602.
<https://doi.org/10.3390/genes3040576>

Wyrsh I, Domínguez-Ferreras A, Geldner N et al (2015) Tissue-specific FLAGELLIN-SENSING 2 (FLS 2) expression in roots restores immune responses in *Arabidopsis* fls2 mutants. *New Phytol* 206:774–784

Yegorenkova I, Konnova S, Sachuk V et al. (2001) *Azospirillum brasilense* colonization of wheat roots and the role of lectin–carbohydrate interactions in bacterial adsorption and root-hair deformation. *Plant Soil* 231:275–282 (2001).
<https://doi.org/10.1023/A:1010340700694>

[Yonekura](#) K, [Maki-Yonekura](#) S, [Namba](#) K (2003) Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature* 424, 643–650

Zhu GY, Dobbelaere S Vanderleyden J (2002) Use of green fluorescent protein to visualize rice root colonization by *Azospirillum irakense* and *A. brasilense*. *Funct. Plant Biol* 29:1279–1285.

7.3.4. PLD α 1 improves saline stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* inoculated with *Azospirillum baldaniorum* Sp245.

Plant Physiology Reports
https://doi.org/10.1007/s40502-025-00872-1



ORIGINAL ARTICLE



PLD α 1 improves saline stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* inoculated with *Azospirillum baldaniorum* Sp245

Estefanía Irepan-Villa¹ · Aynare Yazmín Tapia-Vargas¹ · Estefanía Álvarez-Martínez² · Elvira Romero-Catarino¹ · Alma Alejandra Hernández-Esquivel¹ · Elda Castro-Mercado¹ · José López-Bucio¹ · Ernesto García-Pineda¹✉

Received: 27 March 2025 / Accepted: 19 May 2025
© Indian Society for Plant Physiology 2025

Abstract

Plant growth-promoting rhizobacteria are crucial in enhancing plant tolerance to saline stress. To investigate the role of *Arabidopsis thaliana* phospholipase D α 1 (PLD α 1) and *Azospirillum baldaniorum* Sp245 in adaptation to saline conditions, PLD α 1 WT, overexpressing (OE) and knockout (KO) mutant lines were inoculated with the bacterium. *A. baldaniorum* Sp245 increased biomass and noteworthy, OE plants had greater root hair elongation than KO and WT plants. The root hair phenotype of PLD α 1 overexpressors could be maintained upon 100 mM NaCl application, while biomass production was comparable to the WT. Sp245 improved growth parameters such as lateral root number and total fresh weight under saline conditions in PLD α 1 OE and KO lines, with contrasting effects on root hair development, which was promoted in the OE and abrogated in KO plants. Sp245 inoculation under saline stress promoted stomatal aperture in the WT, OE and KO lines, which correlated with decreased in phosphatidic acid (PA) levels. These findings involve PLD α 1 in orchestrating plant growth, epidermal cell elongation, and PA production in *A. thaliana* as a response to *A. baldaniorum* Sp245 under saline stress. The role of PLD α 1 in modulating stomatal movement in response to inoculation and saline conditions is also discussed.

Keywords Phosphatidic acid · Salt stress · Plant growth · Root hairs · Stomata aperture

Introduction

Soil salinization affects seed germination, crop growth, and productivity (Van Zelm et al., 2020). The underlying osmotic pressure and Na⁺ and Cl⁻ toxicity impairs root meristem activity, disrupt metabolism and photosynthesis and halt overall plant development (Van Zelm et al., 2020; Xiao & Zhou, 2022).

The genus *Azospirillum* has been consolidated as plant growth-promoting bacteria widely applied in agriculture, which colonize over 100 plant species, and positively influence growth, development, and yield under field conditions

(Cassan & Diaz-Zorita, 2016). *Azospirillum* isolates applied in agriculture can tolerate salinity depending on the genotype. For instance, *A. amazonense* typically exhibits the lowest salinity tolerance, while *A. halopraeferens* can withstand salinity levels comparable to seawater, exceeding 3% NaCl. Consequently, *Azospirillum* inoculation's benefits appear to be more pronounced under stress conditions (García et al., 2017).

Azospirillum employs multiple strategies to support plant development under osmotic and saline stress through mechanisms collectively called induced systemic stress tolerance. These include the production of hormones, antioxidants, and osmolytes (Yang et al., 2009). Particularly, *A. brasilense* improved rice growth under salt stress regulating the expression of key genes involved in defense and stress response, abscisic acid and jasmonic acid signaling, and ion and nutrient transport (Degon et al., 2023). In wheat, this rhizobacterium enhanced photosynthesis, chlorophyll content, and growth rate under salt stress (Aijaz et al., 2024).

Additionally, platforms such as the Stress Combinations and Their Interactions in Plants Database (SCIPDb;

✉ Ernesto García-Pineda
egpineda@umich.mx

¹ Instituto de Investigaciones Químico Biológicas,
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad
Universitaria, Edif. A1', 58040 Morelia, Michoacán, Mexico

² Instituto Tecnológico Superior de Ciudad Hidalgo,
61100 Cdad. Hidalgo, Michoacán, Mexico

<http://www.nipgr.ac.in/scipdb.php>) provide valuable data on the morpho-physio-biochemical (phenome) and molecular (transcriptome and metabolome) responses of plants to various stress combinations, including salinity and bacterial stress (Priya et al., 2023).

Phospholipids serve as essential components of cell membranes act as rich sources for producing cellular mediators. Phospholipases break down phospholipids into various products, such as phosphatidic acid (PA), diacylglycerol (DAG), free fatty acids (FFAs), and lysophospholipids (LPLs), all of which play key roles in regulating cellular functions and metabolism. As such phospholipases play diverse and crucial roles in plant growth, development, and responses to abiotic and biotic stresses. Plant phospholipases are grouped into phospholipase D (PLD), phospholipase C (PLC), phospholipase A1 (PLA1), and PLA2 based on the site of glycerophospholipid hydrolysis (Wang, 2001; Wang et al., 2012).

Phospholipase D (PLD) catalyzes the hydrolysis of membrane phospholipids such as phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE), producing a free head group and phosphatidic acid (PA). This PLD-mediated phospholipid breakdown is prominent in plants, and its activity rises under stress conditions (Wang et al., 2012).

The PLD family in *Arabidopsis* includes twelve isoforms: PLD α (1,2,3), PLD β (1,2), PLD γ (1,2,3), PLD δ , PLD ϵ , and PLD ζ (1,2) (Eliás et al., 2002). The α , β , γ , δ , and ϵ PLD types are known as C2-PLDs due to the presence of a C2 domain near their N-terminus. In contrast, the two PLD ζ isoforms lack the C2 domain and instead contain pleckstrin homology (PH) and phox homology (PX) domains (Bargmann & Muunik, 2006).

PLD α 1, PLD α 3 and PLD δ are involved in the salt stress response, and their mutation led to reduced PA levels, increased Na⁺ levels, and a salt-sensitive phenotype (Bargmann et al., 2008; Hong et al., 2008a, 2008b; Yu et al., 2010; Zhang et al., 2012). PLD α 1-derived PA binds to and activates MPK6, which phosphorylates the C-terminus of SOS1, facilitating the removal of excess Na⁺ in *Arabidopsis* (Yu et al., 2010). These findings suggest that the MAPK cascade and SOS pathways are regulated by PLD-derived PA and are involved in salt tolerance. However, whether the changes induced in plants by *A. baldaniourum* Sp245 are mediated by PLD and accounts for enhanced resistance to saline stress. Our study analyzes the role of PLD α 1 in *A. thaliana* plants under saline stress and inoculated with *A. baldaniourum* Sp245.

Material and methods

Plant materials and growth

The *Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0 was utilized in this study. One activating tag T-DNA mutant line *plda1* (SK3822) and one T-DNA insertion mutant line *plda1* (SAIL_81_A03), both in the Col-0 background, were identified using the SiGnAL database from T-DNA lines described by Alonso et al. (2003). Seeds from the activating line belong to the T3 or T4 generation. The null mutant was identified through Thermal Asymmetric Interlaced PCR (TAIL-PCR). Seeds for these lines were obtained from the Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) at Ohio State University.

Seeds were sown on half-strength Murashige and Skoog (MS) medium (pH 5.8) supplemented with 0.1% sucrose and solidified with 1% agar. Following a 2-day stratification period at 4 °C in darkness, the seedlings were grown vertically at a 45-degree angle for 3–4 days under a 12 h light/12 h darkness photoperiod at 23 °C during the light phase and 18 °C during darkness, with a light intensity of 160 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Inoculum preparations

The wild-type *Azospirillum brasilense* Sp245 strain, later reclassified as *Azospirillum baldaniorum* Sp245 (dos Santos Ferreira et al., 2020), used in this study, was provided by Gladys Alexandre (University of Tennessee, USA). Bacteria were cultured in LB medium (pH 7), containing 10 g/L peptone, 5 g/L yeast extract, and 5 g/L NaCl, supplemented with 0.3009 g/L MgSO₄ and 0.277 g/L CaCl₂. For solid medium, 15 g/L agar was added. Cultures were incubated at 27 °C with rotation at 100 rpm.

For inoculum preparation, the bacterial culture protocol described by Spaepen et al. (2014) was followed. Bacteria were grown for 20 h (exponential phase) at 27 °C with rotation at 100 rpm. Cells were then washed twice with 0.9% NaCl by centrifugation (4300 $\times$ g, 10 min, 4 °C), resuspended in 0.01 M MgSO₄, and serially diluted to achieve the desired final concentration of colony-forming units (CFU) for inoculation.

Inoculation of plants

Four days after germination, seedlings were transferred to agar solidified MS 0.2 $\times$ medium for interaction with the rhizobacterium. 10 μL of bacterial culture was applied approximately 1 cm from the edge of the Petri dish. To evaluate the effects of sodium chloride (NaCl) stress, 4-day-old seedlings were transferred to fresh MS 0.2 $\times$ plates (Control) or

MS 0.2 × medium supplemented with 100, 150, or 200 mM NaCl, with or without bacterial treatment. The plates were sealed with Parafilm and incubated vertically for 6 days in a growth chamber. Plant growth parameters were subsequently measured to assess the responses.

Plant growth analysis

After 6 days of growth, plant fresh weight was determined using an analytical balance (Ohaus V14130 Voyager). Root length was measured with a ruler, and lateral root numbers were quantified under a stereomicroscope (Leica EZ4 D). Whole-plant images were captured with a Nikon camera, while root hair images were obtained using a stereomicroscope (Leica MZ6). Stomatal aperture was recorded under a microscope with a digital camera (AmScope FMA050).

Phosphatidic acid extraction

PA content was analyzed using a modified lipid extraction protocol based on Welts et al. (2002). Briefly, 500 mg of tissue were heated at 75 °C for 15 min in 10 mL of isopropanol containing 0.01% butylated hydroxytoluene (BHT). Subsequently, 10 mL of chloroform and 5 mL of water were added, and the mixture was stirred for one hour. The supernatant was collected and combined with chloroform/methanol (2:1) containing 0.01% BHT, followed by stirring for 30 min. This extraction was repeated five times until the tissue appeared white. The combined supernatants were washed sequentially with 1 mL of 1 M KCl and 2 mL of water. The solvent was evaporated under a stream of nitrogen gas, and the dried extract was resuspended in 200 µL of chloroform for storage at -20 °C.

Thin-layer chromatography of phosphatidic acid

Lipid separation was performed using thin-layer chromatography (TLC) with a solvent system consisting of chloroform:methanol:hydroxide (60:35:8 v/v/v). Phospholipids were visualized by spraying the TLC plate with 0.01% primuline dissolved in 80% acetone. After drying, the plate was examined under a transilluminator (312 nm excitation, 605 nm emission), and images were captured (Tanaka et al., 2012). The digitized images were analyzed using ImageJ software to quantify the pixel intensity and area corresponding to the phosphatidic acid stain.

Statistical analysis

The experiments were performed at least three times with comparable results. The data were analyzed using STATISTICA program version 8.0.550. Multivariate analysis

followed by a *post-hoc* test (Tukey's HSD) were used for testing differences. Different letters indicate means that differ significantly ($P < 0.05$).

Results

Growth of WT, *PLDa1*-OE and *PLDa1*-KO *A. thaliana* lines

To assess the role of *PLDa1* on *A. thaliana* growth, the following materials were used: a T-DNA insertional knockout (KO) mutant and an overexpressing (OE) line generated through T-DNA activation tagging. The KO mutant has the T-DNA inserted in the third exon of the *PLDa1* gene, while the OE mutant has the T-DNA activation tag inserted in the third intron (Fig. 1A).

PLDa1-OE *Arabidopsis* plants exhibited an increase in total length, while *PLDa1*-KO plants showed reduced growth compared to the WT. The number of lateral roots was higher in OE plants but significantly decreased in KO plants. Total fresh weight did not show significant changes in OE or KO lines compared to the WT (Fig. 1B–D). Root hair length in OE plants showed a slight reduction, while in KO plants it was similar to the WT (Fig. 1E).

In *PLDa1*-OE plants, stomata were predominantly closed, whereas in KO mutants, they were mainly fully open, compared to WT stomata (Fig. 1F). Additionally, OE plants displayed higher levels of PA than WT. In contrast KO plants exhibited a decrease in its production (Fig. 1G). These findings confirm the critical role of *PLDa1* in plant development.

Growth of WT, *PLDa1*-OE and -KO plants inoculated with *A. baldaniorum* Sp245

To investigate the role of *PLDa1* in *Arabidopsis* response to interaction with *A. baldaniorum* Sp245, WT, OE and KO plants were grown six days post-inoculation, and plant growth parameters were assessed. The total length of the OE and KO lines was comparable to that of inoculated WT plants. Lateral root formation showed a notable increase in WT and mutant plants. Total fresh weight was significantly higher in both OE and KO lines, with a more pronounced increase observed in OE plants (Fig. 2A–C). The rhizobacteria induced changes in root hair length in WT plants. Noteworthy, root hairs were longer in OE plants and shorter in KO plants than inoculated WT plants (Fig. 2D).

Figure 1. Effect of PLD α 1 on *Arabidopsis* growth, stomatal aperture, and phosphatidic acid (PA) production. **A** Gene structure of PLD α 1 and the location of T-DNA insertions. Exons are represented by black boxes. **B–D** Plant growth parameters for wild-type (WT), overexpressing (OE), and knockout (KO) PLD α 1 plants. **E** Photographs of root tips from WT, OE, and KO plants. Scale bar=200 μ m. **F** Stomatal aperture (scale bar=50 μ m) and **G** PA production in WT, OE, and KO plants. Stomatal aperture was analyzed on the abaxial surface of the cotyledonary leaves using a microscope at 100X magnification. The arrowhead indicates the PA band (18:0 distearoyl; 1 mg). Values represent means $\pm$ SD from three experiments. N=30

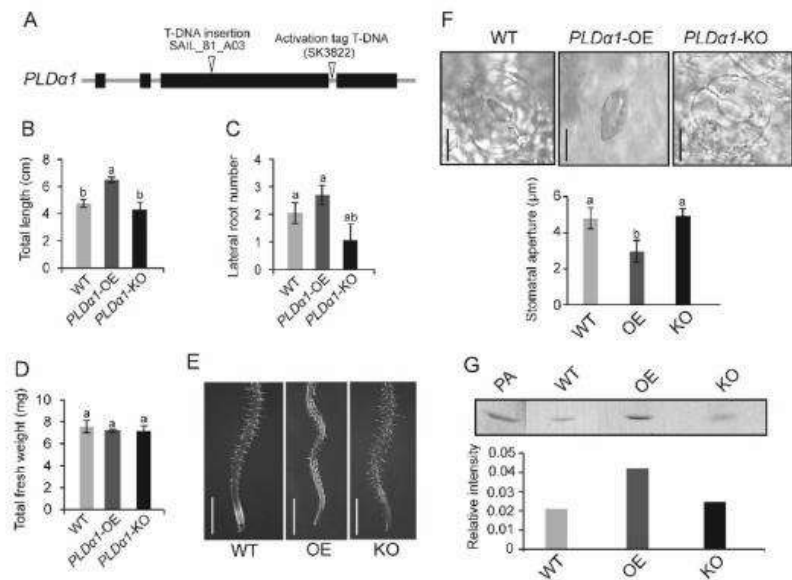
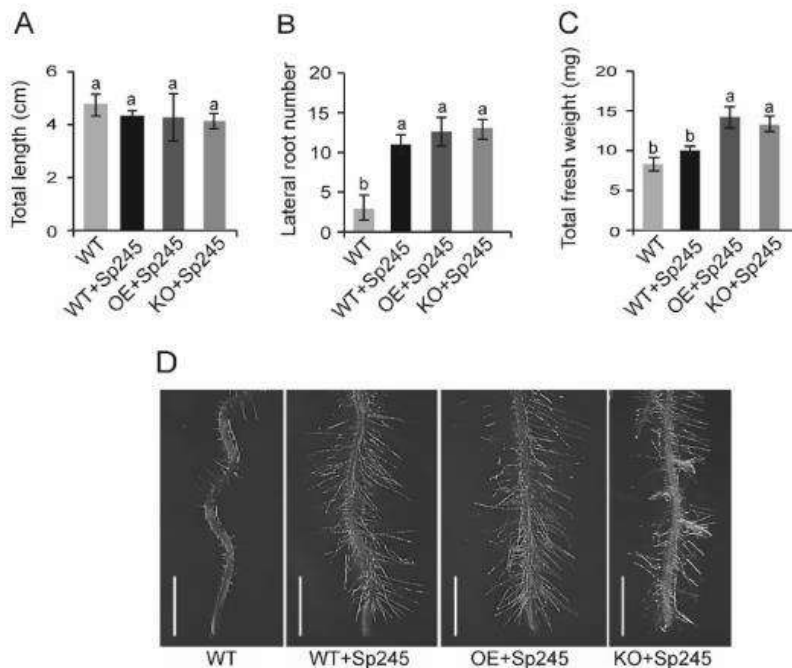


Figure 2. Effect of the inoculation of wild-type (WT), overexpressing (OE), and knockout (KO) PLD α 1 plants with *A. baldaniorum* Sp245. 4-day-old seedlings were selected by their homogeneity in growth and transplanted to fresh MS plates supplemented with the bacteria at 10^6 colony-forming units (CFU)/mL. 6 days after treatment plant growth parameters were analyzed. **A–C** Analysis of total length, lateral root number and total fresh weight parameters. **D** Grayscale stereomicroscope images showing changes in root tip morphology in response to inoculation. Scale bar=200 μ m. Sp245=*A. baldaniorum* Sp245. Values are means $\pm$ SD of three experiments. N=30



Effect Growth of *A. thaliana* inoculated with *A. baldaniorum* Sp245 under saline stress

To assess the impact of saline stress on *Arabidopsis* growth, plants were exposed to 0, 100, 150, and 200 mM NaCl for six days. At 150 mM NaCl, seedlings exhibited impaired

growth and development, with chlorotic foliage. These symptoms were even more pronounced at 200 mM NaCl. Additionally, high salt concentrations significantly inhibited root hair formation (Fig. 3A). Quantitative analysis revealed a NaCl concentration-dependent decrease in total plant length and weight. Chlorophyll levels were also notably

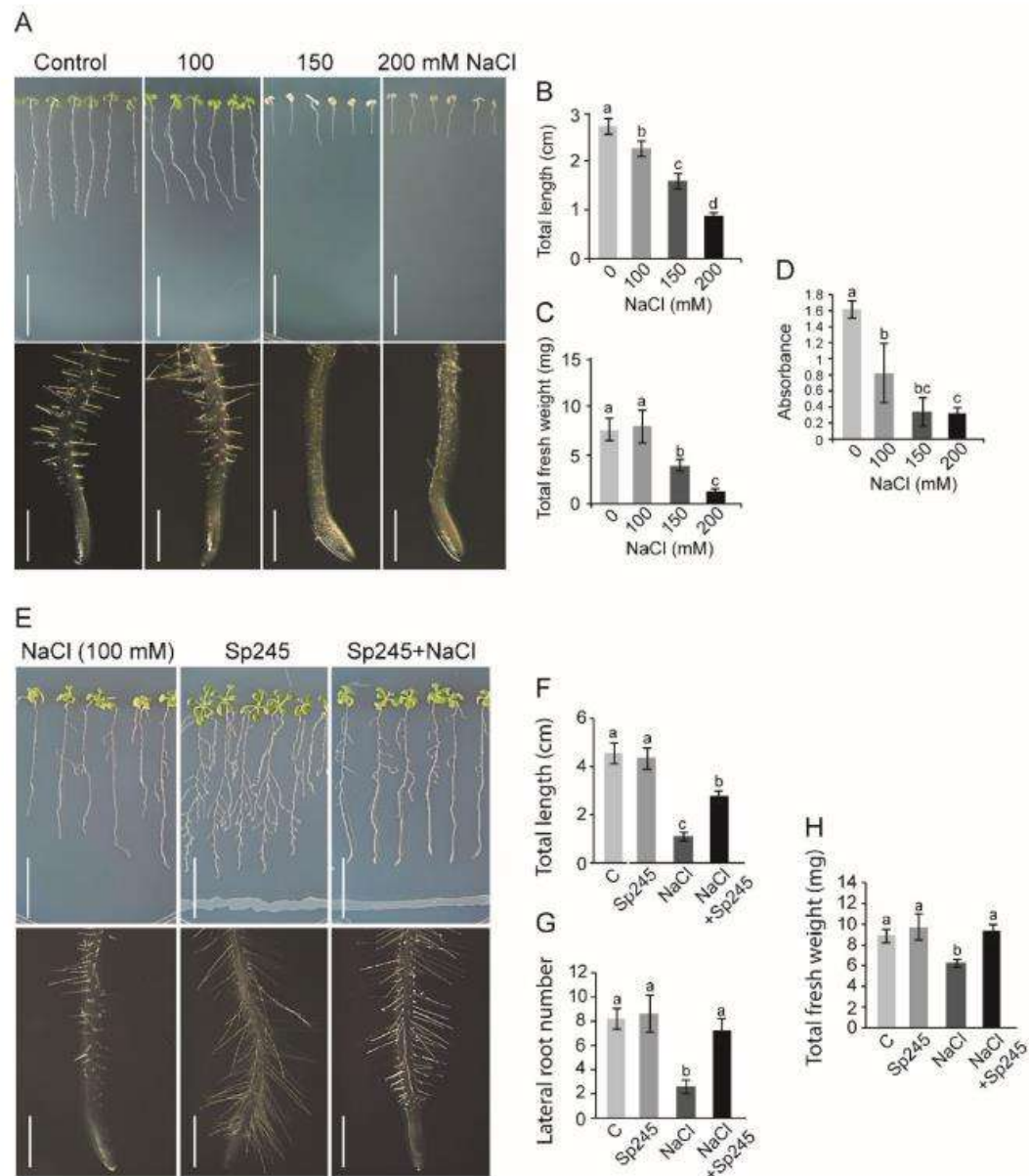


Figure 3. Saline stress in *Arabidopsis* wild-type and growth promotion by *A. baldaniorum* Sp245. **A** Plants development under different NaCl concentration (upper panel) and effect of NaCl of root tip morphology (down panel). **B–C** Plant growth parameters. **E** Effect of the inoculation on development (upper panel) and in the root tip morphology

(down panel) of plants treated with 100 mM NaCl. **F–H** Plant growth parameters. Scale bar for roots=200 μ m, and for seedlings=2 cm. C=Control (untreated plants). Sp245=*A. baldaniorum* Sp245. Values are means $\pm$ SD of three experiments. N=30

reduced at higher NaCl concentrations, thus explaining the leaf chlorosis (Fig. 3B–D).

The effect of saline stress at 100 mM NaCl on *Arabidopsis* biostimulation by *A. baldaniorum* Sp245 was also analyzed. Inoculation mitigated the adverse impact of saline stress, as the rhizobacteria promoted plant growth and

development compared to plants treated with NaCl alone. Notably, the rhizobacteria prevented the inhibition of root hair length caused by NaCl (Fig. 3E). The positive impact of inoculation was evident in a more minor reduction in total length, lateral root number, lateral root length, and total

fresh weight when compared to plants treated solely with NaCl (Fig. 3F–H).

Growth of WT, *PLDα1*-OE and -KO *Arabidopsis* lines under saline stress

To evaluate the impact of saline stress on the growth of WT, *PLDα1*-OE and KO plants, growth was analyzed in medium with 100 mM NaCl for six days. Total length and fresh weight were less inhibited in OE plants than in KO plants, indicating that *PLDα1* activity plays a crucial role in saline stress tolerance (Fig. 4A, C). Conversely, the formation of lateral roots showed a different trend; OE plants exhibited a decrease in lateral root number, while KO plants showed a significant increase (Fig. 4B). Detailed analysis of root hair length revealed that KO plants were more adversely affected than OE plants by NaCl, as root hairs were longer in OE plants (Fig. 4D).

Growth of WT, *PLDα1*-OE and -KO plants under saline stress and inoculated with *A. baldaniorum* Sp245

To further investigate the role of *PLDα1* under saline stress, plants were grown in 100 mM NaCl in the presence of

Sp245 for six days. Quantification of growth parameters showed no significant changes in total length in OE and KO plants compared to inoculated plants treated with saline stress alone. The number of lateral roots was similar to that of inoculated WT plants, and a slight increase in total fresh weight was observed in both OE and KO plants (Fig. 5A–C). These results suggest that the presence of the rhizobacteria is essential for mitigating the effects of saline stress in both mutants. Root hair length was promoted by the rhizobacteria under saline stress in OE and KO lines, although the effect was less pronounced in the KO mutant (Fig. 5D).

Effect of saline stress and *A. baldaniorum* Sp245 inoculation on stomata movement

PLDα1 is known to play a role in regulating stomatal movement (Hong et al., 2008a, 2008b). Next, stomatal status was analyzed in the different treatments. In WT plants, stomatal aperture decreased under saline stress. In contrast in OE plants, NaCl stimulated stomatal opening. In KO plants, stomata remained open (Supplementary Fig. 1A). Interestingly, inoculation with *A. baldaniorum* Sp245 promoted stomatal aperture under saline stress in WT, OE, and KO plants (Supplementary Fig. 1B). These findings suggest that

Figure 4. Effect of saline stress on wild-type (WT), overexpressing (OE), and knockout (KO) *PLDα1* plants. **A–C** Analysis of plant growth parameters. 4-day-old seedlings were selected by their homogeneity in growth and transplanted to fresh MS plates supplemented with 100 mM NaCl. Six days after treatment plant growth parameters were analyzed. (**A–C**) Analysis of total length, lateral root number and total fresh weight parameters. **D** Grayscale stereomicroscope images showing changes in root tip morphology in response to inoculation. Bar = 200 μm. Values are means ± SD of three experiments. N = 30

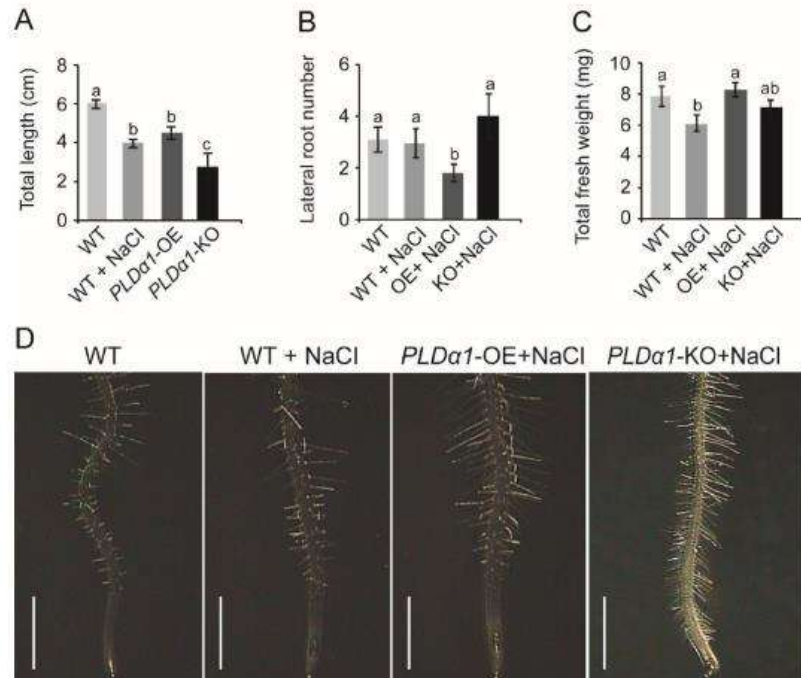
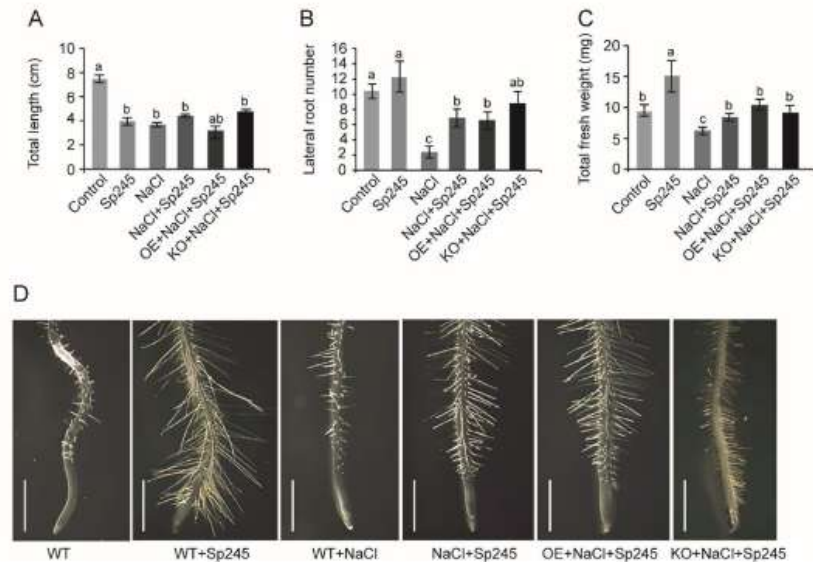


Figure 5. Effect of the inoculation of *A. baldaniorum* Sp245 on wild-type (WT), overexpressing (OE), and knockout (KO) PLD α 1 *Arabidopsis* plants. 4-day-old seedlings were selected by their homogeneity in growth and transplanted to fresh MS plates supplemented with 100 mM NaCl and 10^6 colony-forming units (CFU)/mL of the rhizobacteria. Six days after treatment plant growth parameters were analyzed. **A–C** Analysis of total length, lateral root number and total fresh weight parameters. **D** Grayscale stereomicroscope images showing changes in root tip morphology in response to inoculation. Bar = 200 μ m. Values are means $\pm$ SD of three experiments. Sp245 = *A. baldaniorum* Sp245. N = 30



A. baldaniorum Sp245 may regulate stomatal movement through additional mechanisms beyond PLD α 1 activity.

Phosphatidic acid level in WT, PLD α 1-OE and-KO plants inoculated and under saline stress

Phosphatidic acid (PA) is a lipid second messenger that can be generated directly through PLD enzyme activity (Testerink et al., 2004). The level of PA was analyzed in OE plants, inoculated or not with the rhizobacteria under saline stress. Saline stress reduced PA levels in WT and OE plants compared to untreated WT plants. However, inoculation with the rhizobacteria under saline stress mitigated this decrease (Supplementary Fig. 2A). Basal PA production in KO plants was lower than in WT plants and further decreased upon inoculation. Saline stress inhibited PA accumulation in KO plants, but interestingly, inoculation with *A. baldaniorum* Sp245 slightly restored PA accumulation in both WT and KO mutants (Supplementary Fig. 2B).

Discussion

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) enhances plant resilience to high salt concentrations (El-Saadony et al., 2024). However, little is known about the enzymatic pathways involved in alleviating PGPR-induced saline stress. Phospholipase D (PLD) hydrolyzes membrane lipids to produce phosphatidic acid (PA) and a free head group, a widespread process in plants. PLD plays multiple regulatory roles in various plant processes, including abscisic

acid (ABA) signaling, programmed cell death, root hair patterning, root growth, freezing tolerance, and hyperosmotic stresses (Hong et al., 2008a, 2008b; Wang, 2005). In this study, we investigated the role of *A. thaliana* PLD α 1 in biostimulation by *A. baldaniorum* Sp245 under saline stress. Two *plda1* lines were used; an overexpressing (OE) lines and a knockout (KO) mutant, which impairs PLD α 1 activity. These lines exhibited distinct growth phenotypes, and had altered stomata dynamics, in OE plants for instance, stomata were closed, while in KO plants, stomata remained open, which correlated with phosphatidic acid levels. *Arabidopsis* PLD α 1-OE plants were less affected in total growth and showed longer root hairs than KO plants in the presence of NaCl. These results demonstrate that PLD α 1 activity is crucial to physiology and plant growth of *Arabidopsis*. The changes in root morphology suggest that PLD α 1 activity is essential for the plant response to rhizobacteria, and that this enzyme is necessary for the stimulation of root hair growth by the rhizobacteria.

Root hairs are root epidermal cells facilitating water and nutrient uptake from the soil to the plant. Phospholipases have been implicated in root hair formation (Samaj et al., 2004), such as phospholipase D ζ 1 (PLD1) activity that regulates root hair growth by production of phosphatidic acid (Ohashi et al., 2003). The reduction in root hair growth in *Arabidopsis* deficient in PLD α 1 activity suggests that this phospholipase also plays an essential role in root hair promotion by *A. baldaniorum* Sp245, as well as in the root architectural modifications induced by the rhizobacteria.

PLD α 1 is a vital enzyme mitigating the detrimental effects of salt exposure in plants. When PLD α 1 was knocked out in

Arabidopsis, plants became insensitive to ABA-mediated stomatal closure; resulting in greater water loss than WT plants (Zhang et al., 2004). In contrast, overexpression (OE) of PLD α 1 led to reduced water loss (Sang et al., 2001). In *Brassica napus*, PLD α 1-OE lines showed decreased water loss, improved biomass accumulation, and produced more seeds than WT plants under drought conditions (Lu et al., 2013). It has been reported that ABA activates PLD α 1, leading to the production of phosphatidic acid, which is involved in the regulation of stomatal closure and the reduction of water loss through transpiration in response to water deficit (Mishra et al., 2006; Zhang et al., 2004). Thus, ABA plays a crucial role in plant resistance to drought stress by reducing transpiration and water loss promoting stomatal closure (Mishra et al., 2006).

In *Arabidopsis* plants exposed to saline stress, the deleterious effects observed in WT plants, particularly on root hair development, were alleviated by Sp245 inoculation in both OE and KO plants. It has been reported that the damaging effects of NaCl in plants can be reduced by inoculation with *A. brasilense* Sp245, which partially reversed the adverse effects of salt and osmotic stress on the relative elongation rate of shoots. Several biochemical mechanisms, such as the accumulation of proline and glutamate, in response to NaCl were stimulated by *Azospirillum* (Casanovas et al., 2003). In addition to these responses, rhizobacteria's enzymatic activity of PLD appears to be an essential osmoregulatory mechanism in plants under saline stress.

As expected, stomatal status analysis revealed that stomata were closed in PLD α 1-OE plants and fully open in PLD α 1-KO plants, which correlated with phosphatidic acid production in the mutants. However, when WT, OE, and KO plants were inoculated with Sp245, stomata in all plants were open, and PA production decreased. These physiological responses induced by the rhizobacteria may partly explain their beneficial effects in mitigating the damage to allow plant growth in saline stress, as the plants were biostimulated in the presence of the stressor. Stomatal movements control CO₂ uptake for photosynthesis and water loss through transpiration, which is key to plant productivity and water use efficiency (Lawson & Vialet-Chabrand, 2019). These results suggest that the rhizobacteria may regulate stomatal movement to promote plant growth through the activity of PLD α 1, other PLDs, or other biochemical mechanisms as the response of OE and KO plants to Sp245 were similar in terms of stomatal aperture and PA production. In drought conditions, soil microorganisms alter their osmotic environment to maintain hydration by accumulating solutes to retain water within their cells (Karnwal et al., 2023). Therefore, it would be interesting to monitor the solute content in OE and KO plants to understand better their contribution to the plant response to Sp245 under saline stress.

Although PGPR can facilitate plant growth under drought conditions by reducing water loss through improved diffusive resistance (Sati et al., 2023), or enhancing water and nutrient assimilation via increased nutrient acquisition and availability (Singh et al., 2022; Chieb et al., 2023), the regulation of water loss and CO₂ uptake through stomatal control is crucial for maintaining metabolism and promoting plant growth. This may explain why we observed stomatal opening in plants inoculated with Sp245 under saline stress. In this context, it has been reported that water stress impedes photosynthetic CO₂ absorption by causing stomatal closure, which restricts CO₂ diffusion and inhibits metabolic processes (Ahluwalia et al., 2021; Awan et al., 2015; Marchin et al., 2020). In addition, it has been reported that the stomatal length and stomatal width in leaves of walnut seedlings decreased significantly under drought stress. In contrast, inoculation with *Pseudomonas brassicacearum* X123 under drought stress could increase the stomatal length and width (Jing et al., 2023).

Several mechanisms have been reported by which PGPR promote plant growth and enhance drought stress tolerance, including the improve in root development leading to better water absorption through a more extensive root surface area (Asif et al., 2022; Khan et al., 2020; Oleńska et al., 2020). As observed in our study, root hair elongation mediated by PLD α 1 or other PLD's and stimulated by Sp245 could be an essential mechanism for enhancing drought stress tolerance.

Until now, the role of PLD in mediating root adaptations to saline stress in plants inoculated with rhizobacteria was unknown. Our results demonstrate that this enzyme plays a key role in the *Arabidopsis* morphological changes stimulated by *A. baldaniorum* Sp245. However, the relationship between PLD and *A. baldaniorum* Sp245 remains to be fully elucidated in order to better understand the PLD contribution to the overall response of *Arabidopsis* to saline stress.

Conclusion

We conclude that PLD α 1 plays a role in *A. baldaniorum* Sp245 ability to improve drought stress tolerance in *A. thaliana*, mediating changes in root hair morphology, stomatal movement, and PA levels.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s40502-025-00872-1>.

Author contribution EI-V, AYT-V, EA-M, and ER-C conducted the experiments; AAH-E and EC-M provided technical support; JL-B and EG-P designed the experimental strategy and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding This study was supported by the Consejo Nacional de Hu-

manidades, Ciencias y Tecnologías grant (606505) to AAHE and by the Coordinación de la Investigación Científica from UMSNH to EGP.

Data availability Not Applicable.

Declarations

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

References

- Ahluwalia, O., Singh, P. C., & Bhatia, R. (2021). A review on drought stress in plants: Implications, mitigation and the role of plant growth promoting rhizobacteria. *Resources, Environment and Sustainability*, 5, 100032. <https://doi.org/10.1016/j.resenv.2021.100032>
- Aijaz, N., Zaheer, M. S., Hameed, A., Aslam, H. M. U., Alam, M. W., Riaz, H., Barasathri, J., Aghayeva, S., Bibi, R., Riaz, M. W., & Ali, H. H. (2024). Improving salinity tolerance in wheat plants via inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Bacillus subtilis* for enhanced biomass, growth and physiological process. *Acta Physiologiae Plantarum*, 46, 103. <https://doi.org/10.1007/s11738-024-03727-8>
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., & Gadriab, C. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 301, 653–657. <https://doi.org/10.1126/science.1086391>
- Asif, R., Yasmin, R., Mustafa, M., Ambreen, A., Mazhar, M., Rehman, A., Umbreen, S., & Ahmad, M. (2022). Phytohormones as plant growth regulators and safe protectors against biotic and abiotic stress. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.102832>
- Awan, S. I., Ahmad, S. D., Ali, M. A., Ahmed, M. S., Aurangzeb, A., & Rao, A. R. (2015). Use of multivariate analysis in determining characteristics for grain yield selection in wheat. *Sarhad Journal of Agriculture*, 31, 139–150. <https://doi.org/10.17582/journal.sja/2015/31.2.139.150>
- Bargmann, B. O. R., Laxalt, A. M., ter Riet, B., van Schooten, B., Merquiol, E., Testerink, C., Haring, M. A., Bartels, D., & Munnik, T. (2008). Multiple PLDs required for high salinity and water deficit tolerance in plants. *Plant and Cell Physiology*, 50, 78–89. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn173>
- Bargmann, B., & Munnik, T. (2006). The role of phospholipase D in plant stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 515–522. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.07.011>
- Casanovas, E. M., Barassi, C. A., Andrade, F. H., & Sueldo, R. J. (2003). *Azospirillum*-inoculated maize plant responses to irrigation restraints imposed during flowering. *Cereal Research Communications*, 31, 395–402. <https://doi.org/10.1007/BF03543370>
- Cassan, F., & Díaz-Zorita, M. (2016). *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. *Soil Biology and Biochemistry*, 103, 117–130.
- Chieb, M., & Gachomo, E. W. (2023). The role of plant growth promoting rhizobacteria in plant drought stress responses. *BMC Plant Biology*, 23, 407. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-0440-3-8>
- Degon, Z., Dixon, S., Rahmatallah, Y., Galloway, M., Gulutzo, S., Price, H., Cook, J., Glazko, G., & Mukherjee, A. (2023). *Azospirillum brasilense* improves rice growth under salt stress by regulating the expression of key genes involved in salt stress response, abscisic acid signaling, and nutrient transport, among others. *Frontiers in Agronomy*, 5, 1216503. <https://doi.org/10.3389/fagro.2023.1216503>
- dos Santos Ferreira, N., Hayashi Sant' Anna, F., Massena Reis, V., Ambrosini, A., Gazolla Volpiano, C., Rothballer, M., Schwab, S., Baura, V. A., Balsanelli, E., Pedrosa, F. O., Pereira Passaglia, L. M., Maltempi de Souza, E., Hartmann, A., Cassan, F., & Zilli, J. E. (2020). Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70, 6203–6212. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004517>
- Eliás, M., Potocký, M., Cvrcková, F., & Zárský, V. (2002). Molecular diversity of phospholipase D in 28 angiosperms. *BMC Genomics*, 3, 2.
- El-Saadony, M. T., Saad, A. M., Mohammed, D. M., Fahm, M. A., El-sawi, I. E., Ahmed, A. E., Algopishi, U. B., Elrys, A. S., Desoky, E. S. M., Mosa, W. F., & Abd El-Mageed, T. A. (2024). Drought-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria alleviate drought stress and enhance soil health for sustainable agriculture: A comprehensive review. *Plant Stress*, 14, 100632.
- García, J. E., Maroniche, G., Creus, C., Suárez-Rodríguez, R., Ramírez-Trujillo, J. A., & Groppa, M. D. (2017). *In vitro* PGPR properties and osmotic tolerance of different *Azospirillum* native strains and their effects on growth of maize under drought stress. *Microbiological Research*, 202, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.04.007>
- Hong, Y., Pan, X., Welti, R., & Wang, X. (2008a). Phospholipase Dα3 is involved in the hyperosmotic response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 20, 803–816. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.056390>
- Hong, Y., Zheng, S., & Wang, X. (2008b). Dual functions of phospholipase Dα1 in plant response to drought. *Molecular Plant*, 1, 262–269.
- Jing, D., Liu, B., Ma, H., Liu, F., Liu, X., & Ren, L. (2023). Effects of inoculation with different plant growth-promoting rhizobacteria on the eco-physiological and stomatal characteristics of walnut seedlings under drought stress. *Agronomy*, 13, 1486. <https://doi.org/10.3390/agronomy13061486>
- Karnwal, A., Shrivastava, S., Al-Tawaha, A. R. M. S., Kumar, G., Kumar, A., & Kumar, A. (2023). PGPR-mediated breakthroughs in plant stress tolerance for sustainable farming. *Journal of Plant Growth Regulation*, 43, 2955–2971. <https://doi.org/10.1007/s00344-023-11013-z>
- Khan, N., Ali, S., Tariq, H., Latif, S., Yasmin, H., Mehmood, A., & Shahid, M. A. (2020). Water conservation and plant survival strategies of rhizobacteria under drought stress. *Agronomy*, 10, 1683. <https://doi.org/10.3390/agronomy10111683>
- Lawson, T., & Violet-Chabrand, S. (2019). Speedy stomata, photosynthesis and plant water use efficiency. *New Phytologist*, 221, 93–98. <https://doi.org/10.1111/nph.15330>
- Lu, S., Bahn, S. C., Qu, G., Qin, H., Hong, Y., Xu, Q., Zhou, Y., Hong, Y., & Wang, X. (2013). Increased expression of phospholipase Dα1 in guard cells decreases water loss with improved seed production under drought in *Brassica napus*. *Plant Biotechnology*, 11, 380–389. <https://doi.org/10.1111/pbi.12028>
- Marchin, R. M., Ossola, A., Leishman, M. R., & Ellsworth, D. S. (2020). A simple method for simulating drought effects on plants. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1715. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01715>
- Mishra, G., Zhang, W., Deng, F., Zhao, J., & Wang, X. (2006). A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in *Arabidopsis*. *Science*, 312, 264–266. <https://doi.org/10.1126/science.1123769>
- Ohashi, Y., Oka, A., Rodrigues-Pousada, R., Possenti, M., Ruberti, I., Morelli, G., & Aoyama, T. (2003). Modulation of phospholipid signaling by GLABRA2 in root-hair pattern formation. *Science*, 300, 1427–1430.

- Oleńska, E., Malek, W., Wójcik, M., Swiecicka, I., Thijs, S., & Vangronsveld, J. (2020). Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: A methodical review. *Science of the Total Environment*, 743, 140682. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140682>
- Priya, P., Patil, M., Pandey, P., Singh, A., Babu, V. S., & Senthil-Kumar, M. (2023). Stress combinations and their interactions in plants database: A one-stop resource on combined stress responses in plants. *The Plant Journal*, 116, 1097–1117. <https://doi.org/10.1111/tj.16497>
- Samaj, J., Baluska, F., & Menzel, D. (2004). New signalling molecules regulating root hair tip growth. *Trends in Plant Science*, 9, 217–220.
- Sang, Y., Zheng, S., Li, W., Huang, B., & Wang, X. (2001). Regulation of plant water loss by manipulating the expression of phospholipase D α . *Plant Journal*, 28, 135–144. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113.2001.01138.x>
- Sati, D., Pande, V., Pandey, S. C., & Samant, M. (2023). Recent advances in PGPR and molecular mechanisms involved in drought stress resistance. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 23, 106–124. <https://doi.org/10.1007/s42729-021-00724-5>
- Singh, S. K., Wu, X., Shao, C., & Zhang, H. (2022). Microbial enhancement of plant nutrient acquisition. *Stress Biology*, 2, 3. <https://doi.org/10.1007/s44154-021-00027-w>
- 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.
- Tanaka, T., Kassai, A., Ohmoto, M., Morito, K., Kashiwada, Y., Takai-shi, Y., Urikura, M., Morishige, J., Satouchi, K., & Tokumura, A. (2012). Quantification of phosphatidic acid in foodstuffs using a thin-layer-chromatography-imaging technique. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 60, 4156–4161. <https://doi.org/10.1021/jf300147y>
- Testerink, C., Dekker, H. L., Lim, Z. Y., Johns, M. K., Holmes, A. B., Koster, C. G., Ktistakis, N. T., & Munnik, T. (2004). Isolation and identification of phosphatidic acid targets from plants. *Plant Journal*, 39, 527–536. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2004.02152.x>
- Van Zelm, E., Zhang, Y., & Testerink, C. (2020). Salt tolerance mechanisms of plants. *Annual Review in Plant Biology*, 71, 403–433.
- Wang, G., Ryu, S., & Wang, X. (2012). Plant phospholipases: An overview. *Methods in Molecular Biology*, 861, 123–137.
- Wang, X. (2001). Plant phospholipases. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 211–231.
- Wang, X. (2005). Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses. *Plant Physiology*, 139, 566–573. <https://doi.org/10.1104/pp.105.0.68809>
- Welti, R., Li, W., Li, H., Sang, Y., Biesiada, H., Zhou, H., Rajashekar, C. B., Williams, T. D., & Wang, X. (2002). Profiling membrane lipids in plant stress responses. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 31994–32002.
- Xiao, F., & Zhou, H. (2022). Plant salt response: Perception, signaling, and tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1053699.
- Yang, J., Kloepper, J. W., & Ryu, C. M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, 14, 1–4.
- Yu, L., Nie, J., Cao, C., Jin, Y., Yan, M., Wang, F., Liu, J., Xiao, Y., Liang, Y., & Zhang, W. (2010). Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 188, 762–773. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03422.x>
- Zhang, Q., Lin, F., Mao, T., Nie, J., Yan, M., Yuan, M., & Zhang, W. (2012). Phosphatidic acid regulates microtubule organization by interacting with MAP65-1 in response to salt stress in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24, 4555–4576. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.104182>
- Zhang, W., Qin, C., Zhao, J., & Wang, X. (2004). Phospholipase D α 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 9508–9513. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402112101>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

7.3.5. The growth promotion of *Arabidopsis thaliana* by *Serratia* Sp. H6 requires the metabolic stress sensor SNF1-related protein kinase 1 (SnRK1).

Acta Physiologiae Plantarum (2025) 47:63
https://doi.org/10.1007/s11738-025-03812-6

ORIGINAL ARTICLE



The growth promotion of *Arabidopsis thaliana* by *Serratia* sp. H6 requires the metabolic stress sensor SNF1-related protein kinase 1 (SnRK1)

Diana Vázquez-Lemus¹ · Esmeralda Guadalupe Rodríguez-Cuevas¹ · Alma Alejandra Hernández-Esquivel¹ · Elda Castro-Mercado¹ · Homero Reyes-de la Cruz¹ · Jesús Campos-García¹ · José López-Bucio¹ · Ernesto García-Pineda¹

Received: 5 July 2023 / Revised: 11 March 2025 / Accepted: 23 May 2025

© The Author(s) under exclusive licence to Franciszek Górski Institute of Plant Physiology, Polish Academy of Sciences, Kraków 2025

Abstract

The SNF1 (sucrose non-fermenting1)-related protein kinase1 (SnRK1) is the plant ortholog of the budding yeast SNF1 and mammalian AMP-activated protein kinase (AMPK). These conserved proteins function as metabolic sensors activated in response to decreasing energy levels. Here, we analyzed the role of SnRK1 in the interaction of *Arabidopsis thaliana* with the plant growth-promoting rhizobacterium (PGPR) *Serratia* sp. H6, under low-energy conditions, using molecular and pharmacological approaches. In the absence of sucrose in the plant growth medium, *Serratia* sp. H6 phytostimulated and promoted the growth of the *A. thaliana* mutant *kin10*, which has impaired SnRK1 catalytic activity, as assessed by changes in lateral root number, root length, and fresh weight. Under the same growth conditions, the mammalian AMPK inhibitor dorsomorphin (DM) at 5 μ M notably decreased plant growth and cell division in the root meristem, inhibiting the phytostimulation by the rhizobacterium. In contrast, the addition of resveratrol (RSV) at 25 or 50 μ M, an activator of mammalian AMPK, in the presence of *Serratia* sp. H6 and without sucrose, improved cell division in the root meristem, the formation of lateral roots, and the phytostimulatory effects on *A. thaliana*. RSV was unable to restore phytostimulation in *kin10* and *snrk1.3* mutant plants. These pharmacological studies suggest that SnRK1 activity is required for the growth promotion of *A. thaliana* by the rhizobacterium under low-energy levels. Our findings show that SnRK1 plays a key role in the growth of *A. thaliana* promoted by *Serratia* sp. H6, under metabolic stress.

Keywords Dorsomorphin · Energy sensor · Plant growth · Resveratrol · Rhizobacteria · Sucrose

Introduction

Plants must continually sense and integrate numerous internal and external stimuli to optimize growth and development. Specific receptors perceive different stimuli and, in coordination with signaling cascades, produce appropriate cell responses, such as metabolic adaptation, to regulate cell growth and division.

The energetic balance must be sensed in such a way as to define which cellular signaling cascades should be activated or inactivated to economize functional energetics. This metabolic plasticity also allows different pathways to maintain energetic levels during cell growth. Molecular sensors can perceive changes in the energetic balance of the cell and redistribute metabolic activity to conserve cell energy homeostasis.

Plant SnRK1 (SNF1-related protein kinase 1) belongs to a highly conserved eukaryotic protein kinase family, as documented by various studies (Hardie 2012; Polge and Thomas 2007; Hedbacker and Carlson 2008). This kinase serves as a metabolic sensor. AMPK is the mammalian counterpart of plant SnRK1. The activation of AMPK, triggered by increases in AMP and ADP levels relative to ATP during glucose starvation, is facilitated by the allosteric binding of AMP to its γ -subunit (Carling et al. 1987; Scott et al.

Communicated by C.L. Cespedes.

✉ Ernesto García-Pineda
egpineda@umich.mx

¹ Instituto de Investigaciones Químico Biológicas,
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad
Universitaria, Edif. A1*, Morelia, Michoacán CP 58040,
México

Published online: 05 June 2025

Springer

2004; Gowans et al. 2013). The binding of ADP and AMP to the γ -subunit also induces a conformational change in the AMPK complex, rendering it resistant to dephosphorylation and inactivation by phosphatases (Davies et al. 1995; Suter et al. 2006; Oakhill et al. 2011; Xiao et al. 2011). After activation, AMPK executes an energy-saving program by directly regulating enzymes and controlling transcription (Hardie 2007). The activation turns off certain anabolic processes, including the synthesis of fatty acids, cholesterol, and proteins, while simultaneously activating catabolic pathways such as fatty acid oxidation, glycolysis, and autophagy (Hardie et al. 2012).

AMPK, SNF1, and SnRK1 function as heterotrimeric complexes, each comprising a catalytic α -subunit and regulatory β - and γ -subunits (Hedbacker and Carlson 2008; Hardie et al. 2012; Broeckx et al. 2016). The α -subunits consist of a highly conserved N-terminal Ser/Thr kinase domain and a large C-terminal regulatory domain facilitating interactions with the β - and γ -subunits. Phosphorylation of the kinase domain is a prerequisite for AMPK/SNF1/SnRK1 kinase activity. The β -subunits serve as scaffolds for the complex and contribute to the localization of the complex and substrate specificity (Estruch et al. 1992; Hawley et al. 1996; Baena-González et al. 2007). In mammals, SNF1 is activated in response to low glucose concentrations and promptly inactivated by the addition of glucose (Hedbacker and Carlson 2008; Itani et al. 2003; Minokoshi et al. 2004). AMPK is negatively regulated by amino acids such as leucine or glutamine, citrate, and palmitate (Gleason et al. 2007; Cesquini et al. 2008; Wu et al. 2007). Glycogens with a high degree of branching bind to AMPK β -subunits, promoting allosteric inhibition of kinase activity (McBride et al. 2009).

Pharmacologically, AMPK is inhibited by the small molecule dorsomorphin (DM), also known as compound C. DM is a cell-permeable pyrazolopyrimidine derivative that acts as a potent and reversible ATP-competitive inhibitor of the complex. It is highly selective for AMPK and does not significantly inhibit several structurally related kinases (Gao et al. 2008). Conversely, the natural polyphenol resveratrol (RSV) activates AMPK (Kulkarni and Cantó 2015).

In *A. thaliana*, SnRK belongs to a superfamily of proteins comprising three distinct subfamilies: SnRK1, SnRK2, and SnRK3 (Hrabak et al. 2003). The SnRK2 and SnRK3 subfamilies are involved in stress and abscisic acid (ABA) signaling, encompassing 35 more divergent protein kinases specific to plants (Weinl and Kudla 2009; Umezawa et al. 2010). The SnRK1 subfamily consists of SnRK1 α 1/SnRK1 α 2/SnRK1 α 3 (also known as SnRK1.1/SnRK1.2/SnRK1.3, AKIN1 α /AKIN2 α /AKIN3 α , KIN10/KIN11/KIN12, or AKIN10/AKIN11/AKIN12). In *A. thaliana*, only the catalytic subunits SnRK1 α 1/SnRK1 α 2 of the SnRK1 complex appear to be expressed (Baena-Gonzalez et al. 2007).

SnRK1, in response to energy deprivation, governs both metabolism and transcription, and its activity is hindered by sugars that restore an energy balance (Polge and Thomas 2007; Baena-Gonzalez and Sheen 2008; Rodrigues et al. 2013). Playing a pivotal role, SnRK1 is crucial in the acclimation of plants to a broad spectrum of biotic and abiotic stresses (Hao et al. 2003; Lovas et al. 2003; Schwachtje et al. 2006; Baena-Gonzalez et al. 2007; Lee et al. 2009).

In plants, trehalose 6-phosphate (T6P) stands out as a significant regulator of SnRK1 (Schluepmann et al. 2012). The accumulation of T6P demonstrates a high correlation with sucrose levels, leading to the proposition that T6P serves as a messenger conveying information about carbohydrate availability to energy level sensors (Lunn et al. 2006). SnRK1 activity faces inhibition not only from T6P but also from other sugars, including glucose-6-phosphate (G6P), glucose-1-phosphate (G1P), glucose, and sucrose (Toroser et al. 2000; Wu and Birch 2010; Nunes et al. 2013). An intriguing observation is that *A. thaliana* SnRK1 exhibits insensitivity to both AMP and ADP, and it shows resistance to in vitro dephosphorylation. This suggests that plant SnRK1 is an atypical member within the AMPK family (Emanuelle et al. 2015).

There is evidence suggesting that the KIN10 and KIN11 protein kinases (corresponding to SnRK1 α 1/SnRK1 α 2) are, to a certain extent, interchangeable (Baena et al. 2007). This is supported by the observation that double knockout mutants of the KIN10 and KIN11 genes exhibit a lethal phenotype, indicating the highly related functions of these two protein kinases (Baena et al. 2007). However, it is presumed that the KIN10 protein kinase is mainly responsible for the majority of the activity and functionality within the SnRK1 complexes (Jossier et al. 2009).

Interactions between plants and plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) induce significant metabolic alterations in both primary and secondary metabolism (Jeon et al. 2021), leading to various morphological changes in foliage and roots. The generation and utilization of soluble sugars during plant primary metabolism are also influenced by PGPR (Jeon et al. 2021). To support the changes contributing to plant growth, adjustments in metabolic activity must be meticulously regulated to maintain suitable levels of energetic molecules necessary for vital functions and morphological changes, particularly under low-nutrient conditions.

Serratia is a genus of Gram-negative bacteria known to enhance plant growth, particularly on *A. thaliana*, a model plant commonly used in plant biology research. *Serratia* sp. facilitates plant growth by augmenting root length, root surface area, and overall plant biomass. Additionally, it produces indole acetic acid (IAA) and forms biofilm on roots, further enhancing the interaction between the plant and bacteria, thereby promoting growth (González-Ista et al. 2023).

were slightly stimulated by H6 in the *kin10* mutant. In the absence of sucrose, phytostimulation in the *kin10* mutant was sustained and even higher than in wild-type plants. Taken together, these results suggest that the *kin10* mutant maintains the capacity to respond to phytostimulation by *Serratia* sp. H6 in the absence of sucrose.

Dorsomorphin treatment and plant growth response

Since the molecular approach using the *kin10* mutant did not show a clear role of SnRK1 during the phytostimulation of *A. thaliana* by *Serratia* sp. H6, we examined the pharmacological inhibition of SnRK1 activity by dorsomorphin (DM), an ATP-competitive mammalian AMPK inhibitor, in the absence of sucrose. Firstly, the effect of 5 μ M DM on uninoculated plant growth was analyzed. Seedlings treated for six days with DM were smaller than control plants by approximately 50% (Fig. 2A,B), and the chemical decreased cell division in the root meristem (Fig. 2C,D). Additionally, DM clearly inhibited root hair elongation (Fig. 2E). Collectively, these results suggest that SnRK1 activity is crucial for mediating plant growth under limited nutrient conditions.

When plants were inoculated with different concentrations of DM, the biostimulatory effect of the rhizobacteria on *Arabidopsis* was attenuated in a DM concentration-dependent manner. These effects were observed in both root and foliage development (Fig. 3A), with the 5 μ M and 10 μ M concentrations showing the most significant reductions in plant development (Fig. 3B–D). The inhibitory effect of 5 μ M DM in the presence of *Serratia* sp. H6 was similar to that observed in uninoculated plants, suggesting that SnRK1 inhibition is essential for the rhizobacteria-induced stimulation of plant growth. Furthermore, DM was found to be non-toxic to *Serratia* sp. H6, as it did not negatively affect its growth (Supplementary Fig. 2).

Resveratrol effect on plant growth with *Serratia* sp. inoculation

The effect of chemically activating SnRK1 on plant growth stimulated by *Serratia* sp. H6 in the absence of sucrose was analyzed employing resveratrol (RSV), a natural phenol known to activate mammalian AMPK (Wang et al. 2012). Interestingly, all plant growth parameters increased with both RSV concentrations (25 or 50 μ M), especially in the presence of the rhizobacteria, compared to the control (Fig. 4A–C). In fact, in inoculated plants, the increase in lateral root formation was dose dependent. The growth of *Serratia* sp. H6 was not affected by the tested RSV concentrations (Fig. 4D). The effect of RSV on cell division in the root meristem was also analyzed. Cell division decreased in the growth medium without sucrose compared to the

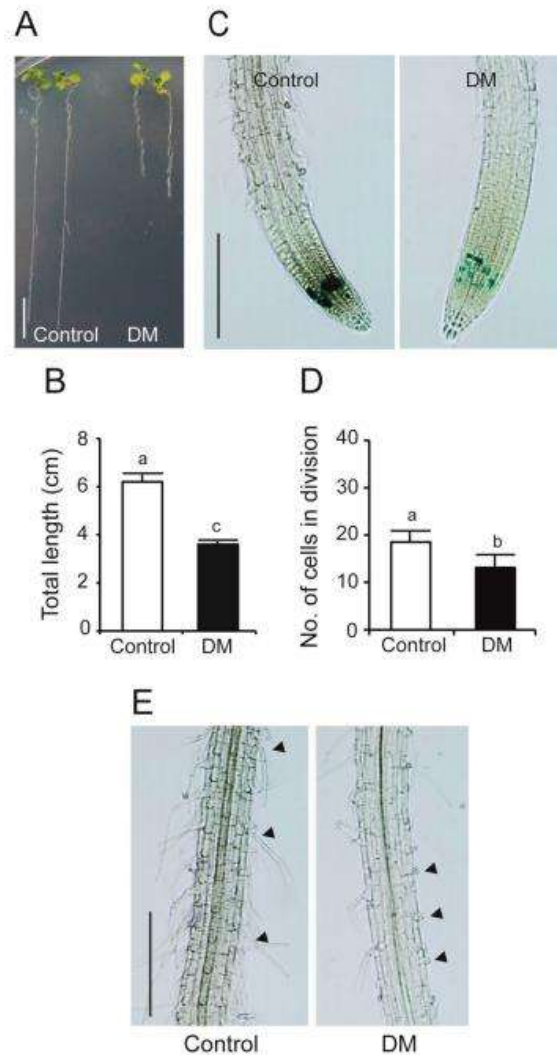


Fig. 2 Dorsomorphin (DM) inhibits *A. thaliana* growth in medium without sucrose. DM decreased plant size (A, B), cell division in root meristem (C, D), and the length of root hairs (E). Bar scale to C and E = 200 μ m, and to A = 1 cm. n = 30. Black arrowheads indicate root hairs. DM = Dorsomorphin. Letters on the bars indicate statistically significant differences according to Tukey's HSD test ($p < 0.05$)

medium with sucrose. When RSV was added to the medium without sucrose, cell division appeared to further decrease. However, when plants were inoculated with *Serratia* sp. H6, the number of cells in division increased at a 25 μ M RSV concentration (Fig. 5A,B). An interesting effect of RSV in inoculated plants was a notable increase in the initiation of lateral roots, confirming the observed increase in lateral root formation (Fig. 5C).

Finally, the specificity of RSV on SnRK1 activity was investigated using the SnRK1 mutants *kin10* and *snrk1.3*

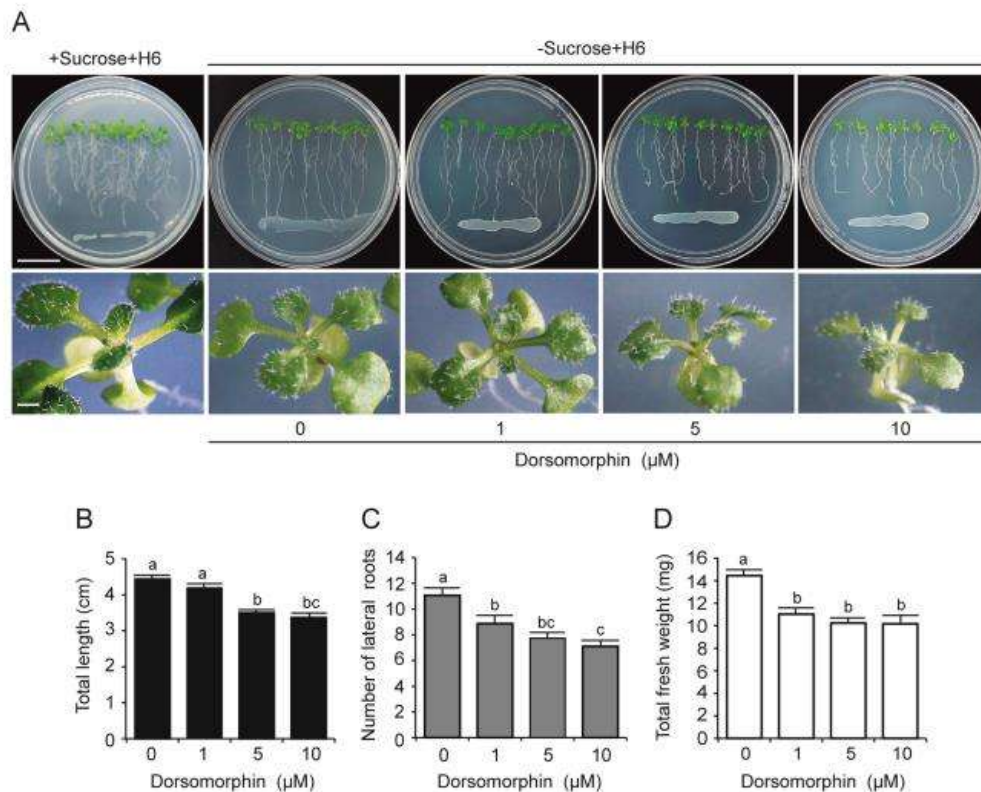


Fig. 3 Effect of different DM concentration on plant growth stimulation by *Serratia* sp. H6. **A** Aspect of whole plant and foliage of inoculated plants. Bar in Petri plates = 2 cm, and in the foliage = 1 mm.

B–D Quantification of plant growth parameters. Letters on the bars indicate statistically significant differences according to Tukey's HSD test ($p < 0.05$)

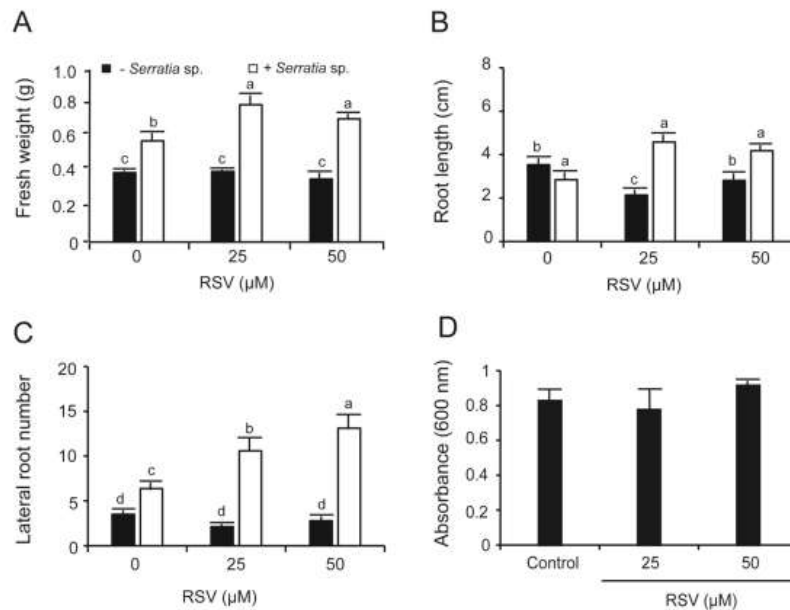
(KIN12) in the presence or absence of sucrose. In the absence of sucrose, RSV at 50 μM enhanced the growth of wild-type plants after 13 days of treatment (Fig. 6A). In the presence of sucrose, wild-type *Arabidopsis* growth was clearly stimulated by *Serratia* sp. H6. Interestingly, in the absence of sucrose, the addition of RSV maintained the rhizobacteria-induced biostimulation and even appeared to potentiate it. In both mutants, when treated with RSV in the absence of sucrose, the biostimulation was reduced compared to the growth of wild-type plants inoculated and treated with RSV (Fig. 6B). Although rhizobacteria inoculation enhanced growth parameters in the mutants, the stimulation did not reach the levels observed in wild-type plants treated with RSV in the absence of sucrose (Fig. 6C–E). These results suggest that RSV may contribute to improved plant growth under low-energy conditions in inoculated plants, potentially by stimulating SnRK1 activity.

Discussion

AMPK is a ubiquitous sensor of cellular energy and nutrient status in eukaryotic cells (Hardie 2012). In plants, SnRK1 serves as the equivalent of AMPK in mammals, but studies on its role in plant interactions with beneficial bacteria remain limited. Given that plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) primarily enhance plant growth under stress conditions such as nutrient deficiency, analyzing the role of this key energy sensor during plant–PGPR interactions is essential.

In this study, we first examined the role of SnRK1 in *Serratia* sp.–*A. thaliana* interaction by utilizing the *kin10* mutant, which carries a mutation in KIN10, the catalytic α-subunit of SnRK1, impairing its kinase activity (Simon et al. 2018). Our hypothesis was that, with reduced catalytic activity of SnRK1 in the *kin10* mutant,

Fig. 4 Resveratrol (RSV) enhances *A. thaliana* growth when inoculated with *Serratia* sp. H6. **A–C** Growth parameters were analyzed six days after treatment. **D** *Serratia* sp. H6 growth after 24 h in the presence of 25 or 50 μ M RSV. $n=30$. Letters on the bars indicate statistically significant differences according to Tukey's HSD test ($p < 0.05$)



PGPR-inoculated plants would show little to no phyto-stimulation under low-energy conditions (i.e., without sucrose), as the catabolic metabolism typically stimulated by SnRK1 would not occur. However, we observed that *kin10* plants inoculated with PGPR and grown without sucrose still retained the ability to respond to the bacteria. This suggests that SnRK1 may not be essential for plants to biologically respond to rhizobacteria, or that the *kin10* mutant, due to its redundancy, may not be suitable for studying the role of SnRK1 in plant growth promotion by rhizobacteria under metabolic stress.

Given these inconclusive results, we next investigated the effects of chemically inhibiting SnRK1 on the interaction. Using the mammalian AMPK inhibitor, DM (5 μ M), we found that *A. thaliana* growth was significantly reduced in the absence of sucrose, with noticeable effects on cell division in the root meristem and root hair length. These results suggest that DM could be a useful tool for studying the biological role of SnRK1 in plants. Furthermore, the growth inhibition persisted during *Serratia* sp. inoculation, indicating that functional SnRK1 is essential for plants to respond to rhizobacteria. Previous studies have shown that 1 μ M DM inhibits approximately 73% of AMPK activity (Bain et al. 2007), while 10 μ M fully blocks its activity (Yu et al. 2008). Thus, the concentration of DM used in this study appears to be effective in inhibiting SnRK1 activity in plants, though the precise level of inhibition at this concentration remains to be determined.

We also explored the effects of pharmacologically activating SnRK1 in inoculated plants. The addition of the AMPK activator, RSV, improved *A. thaliana* growth promoted by *Serratia* sp. in the absence of sucrose. These results complement those obtained with DM, reinforcing the crucial role of SnRK1 in regulating metabolism necessary for plant growth stimulation by rhizobacteria. This conclusion is further supported by observations in SnRK1 mutants, which failed to recover the biostimulatory effects of rhizobacteria.

RSV is a natural phenol produced by plants in response to injury or pathogen attack (Vestergaard and Ingmer 2019) and is known for its ability to inhibit mTOR signaling and activate AMPK (Wildlund et al. 2013; Shishodia and Aggarwal 2006). While it remains unclear whether RSV activates plant SnRK1 directly or indirectly, our results suggest that it may modulate SnRK1 activity in *A. thaliana*. In mammals, RSV alters the AMP/ATP ratio (Gledhill et al. 2007; Kulkarni and Cantó 2015) and stimulates AMP binding to the γ -subunit of AMPK (Scott et al. 2004; Carling et al. 1989; Oakhill et al. 2010; Gowans et al. 2013). Additionally, glucose starvation and the associated increase in ADP levels may help protect SnRK1 from dephosphorylation, thus maintaining its activity (Mayer et al. 2011). Whether similar mechanisms are involved in SnRK1 activation by RSV in plants remains to be investigated.

Although the physiological role of SnRK1 in plants is not yet fully understood, it is known to regulate carbohydrate metabolism by modulating the transcription of genes

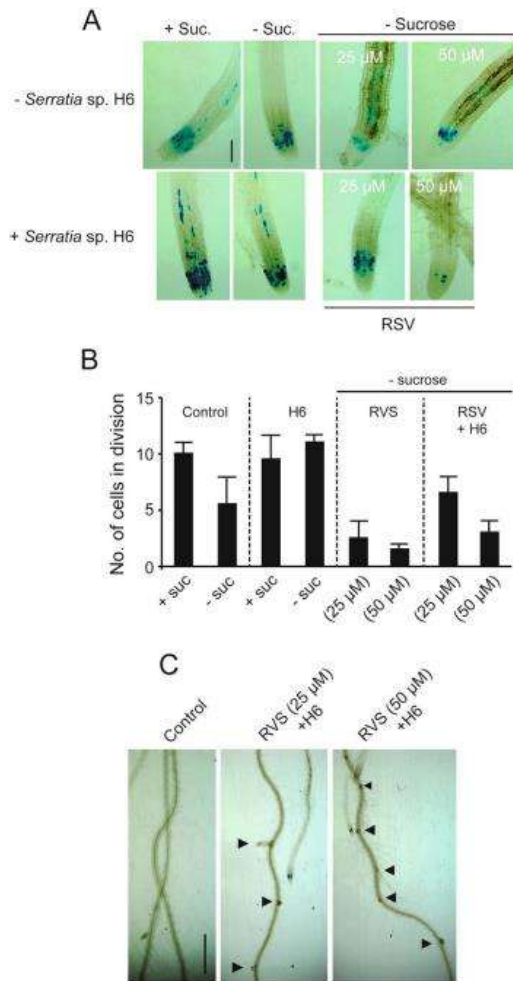


Fig. 5 RSV increases cell division and lateral root formation in *A. thaliana* inoculated with *Serratia* sp. H6. **A**, **B** Cell division was analyzed and quantified in the root meristem. **C** Black arrowheads indicate the formation of lateral roots. Bar in **A** = 100 μ M and bar in **C** = 1 mm. $n = 30$

expressing antisense *A. thaliana* SnRK1, inhibiting this kinase was shown to increase plant susceptibility to viral infection, while its overexpression enhanced resistance (Hao et al. 2003). Our findings contribute to understanding the role of SnRK1 in plant–rhizobacteria interactions and highlight its importance as an energy sensor in regulating plant responses to beneficial microbes.

Conclusions

Our results show that under metabolic stress, the energy sensor SnRK1 plays a key role in mediating plant growth biostimulation by *Serratia* sp. in *A. thaliana*. Further research is required to identify the molecular targets regulated by SnRK1 and to explore how these targets may influence plant–rhizobacteria interactions.

involved in sucrose and starch degradation (Purcell et al. 1998; Laurie et al. 2003), thereby influencing plant development (Zhang et al. 2001). AMPK-like kinases also play a role in plant–pathogen interactions. In tobacco plants

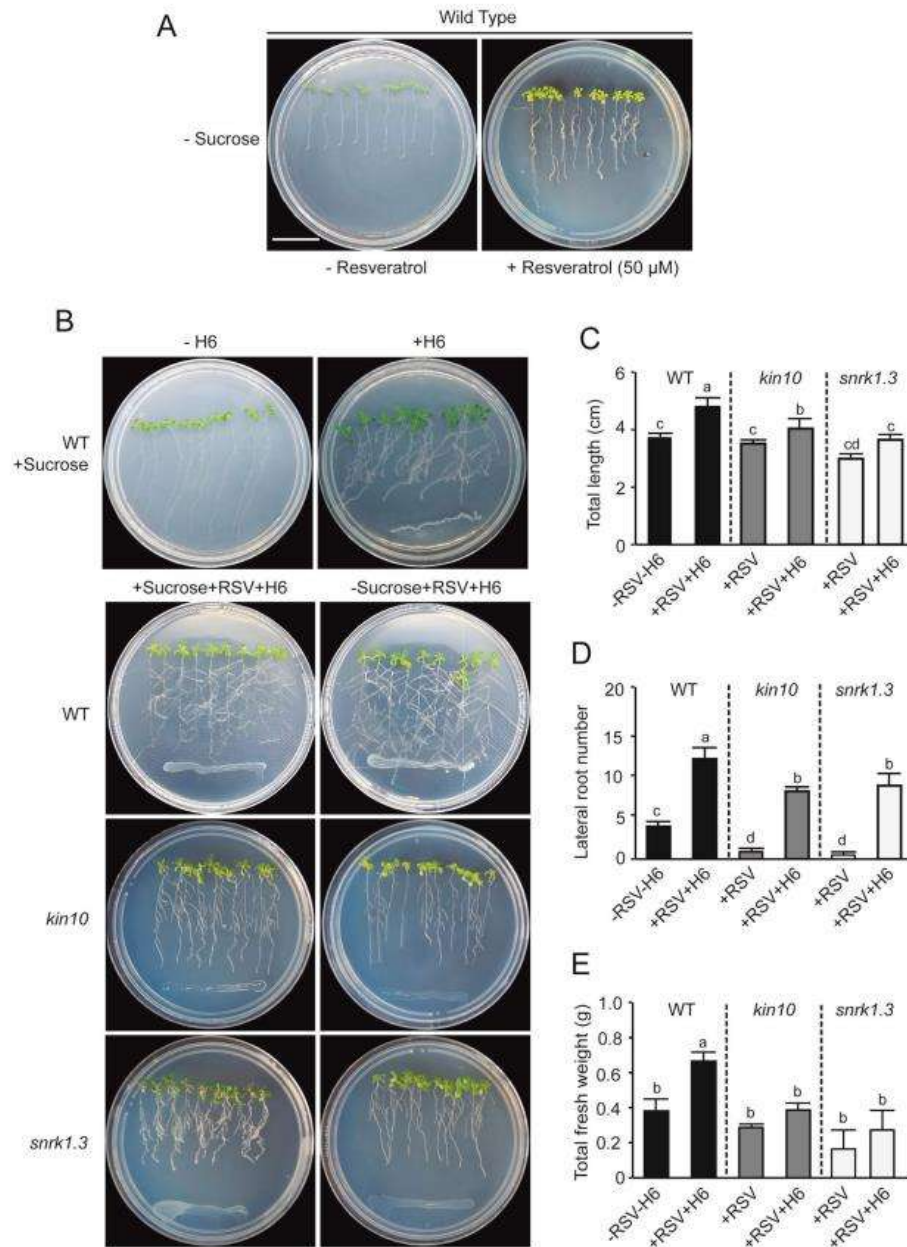


Fig. 6 Effect of RSV on the growth of *KIN10* and *SnRK1.3* *A. thaliana* mutants. **A** Growth of wild-type (WT) plants treated with 50 µM RSV. **B** Appearance of WT and mutant plants inoculated and treated

with 50 µM RSV. **C–D** Quantification of plant growth parameters. Scale bar = 2 cm. Different letters above bars indicate statistically significant differences based on Tukey's HSD test ($p < 0.05$)

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s11738-025-03812-6>.

Acknowledgements The authors want to thank to Arabidopsis Biological Resource Center for the *A. thaliana* *kin10* seeds.

Author contribution statement H.R.-C., J.C.-G., J.L.-B. and E.G.-P. contributed to the design of the work and the manuscript redaction. D.V.-L., E.G.R.-C., A.A.H.-E., and E.C.-M. performed data collection and provided technical assistance for the experiments. The first draft of the manuscript was written by E.G.-P. All authors read and approved the final manuscript.

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

Data availability The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Competing interests The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

Consent for publication All authors approved the submitted draft of this manuscript and agree to be responsible for their contributions to this publication.

References

- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndeubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseeuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301:653–656
- Baena-Gonzalez E, Sheen J (2008) Convergent energy and stress signaling. *Trends Plant Sci* 13(9):474–482
- Baena-Gonzalez E, Rolland F, Thevelein JM, Sheen J (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* 448:938–942
- Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, Klevernic I, Arthur JS, Alessi DR, Cohen P (2007) The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* 408(3):297–315
- Broeckx T, Hulsmans S, Rolland F (2016) The plant energy sensor: evolutionary conservation and divergence of SnRK1 structure, regulation, and function. *J Exp Bot* 67(22):6215–6252
- Carling D, Zammit VA, Hardie DG (1987) A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett* 223(2):217–222
- Carling D, Clarke PR, Zammit VA, Hardie DG (1989) Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities. *Eur J Biochem* 186(1–2):129–136
- Cesquini M, Stoppa GR, Prada PO, Torsoni AS, Romanatto T, Souza Saad MJ, Velloso LA, Torsi MA (2008) Citrate diminishes hypothalamic acetyl-CoA carboxylase phosphorylation and modulates satiety signals and hepatic mechanisms involved in glucose homeostasis in rats. *Life Sci* 82(25–26):1262–1271
- 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(4):503–508
- Davies SP, Helps NR, Cohen PT, Hardie DG (1995) 5-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Lett* 377(3):421–425
- Emanuelle S, Hossain MI, Moller IE, Pedersen HL, van de Meene AML, Doblin MS, Koay A, Oakhill JS, Scott JW, Willats WGT, Kemp BE, Bacic A, Gooley PR, Stapleton DI (2015) SnRK1 from *Arabidopsis thaliana* is an atypical AMPK. *Plant J* 82(2):183–192
- Estruch F, Treitel MA, Yang X, Carlson M (1992) N-terminal mutations modulate yeast SNF1 protein kinase function. *Genetics* 132(3):639–650
- Gao Y, Zhou Y, Xu A, Wu D (2008) Effects of an AMP-activated protein kinase inhibitor, compound C, on adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. *Biol Pharm Bull* 31(9):1716–1722
- Gleason CE, Lu DH, Witters LA, Newgard CB, Birnbaum MJ (2007) The role of AMPK and mTOR in nutrient sensing in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 282(14):10341–10351
- Gledhill JR, Montgomery MG, Leslie AG, Walker JE (2007) Mechanism of inhibition of bovine F1-ATPase by resveratrol and related polyphenols. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(34):13632–13637
- González-Ista NS, Castro-Mercado E, Reyes-de la Cruz H, Campos-García J, López-Bucio J, García-Pineda E (2023) Comparison of the rhizobacteria *Serratia* sp. H6 and *Enterobacter* sp. L7 on *Arabidopsis thaliana* growth promotion. *Curr Microbiol*. 80(4):117
- Gowans GJ, Hawley SA, Ross FA, Hardie DG (2013) AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation. *Cell Met* 18(4):556–566
- Hao L, Wang H, Sunter G, Bisaro DM (2003) Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with and inactivate SNF1 kinase. *Plant Cell* 15(4):1034–1048
- Hardie DG (2007) AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(19):774–785
- Hardie DG, Ross FA, Hawley SA (2012) AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(4):251–262
- Hawley SA, Davison M, Woods A, Davies SP, Beri RK, Carling D, Hardie DG (1996) Characterization of the AMP-activated protein kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 271(44):27879–27887
- Hedbacker K, Carlson M (2008) SNF1/AMPK pathways in yeast. *Front Biosci* 13:2408–2420
- Hrabak EM, Chan CW, Gribskov M, Harper JF, Choi JH, Halford N, Kudla J, Luan S, Nimmo HG, Sussman MR, Thomas M, Walker-Simmons K, Zhu J-K, Harmon AC (2003) The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol* 132(2):666–680
- Itani SI, Saha AK, Kurowski TG, Coffin HR, Tornheim K, Ruderman NB (2003) Glucose autoregulates its uptake in skeletal muscle – involvement of AMP-activated protein kinase. *Diab Met Res Rev* 52(7):1635–1640
- Jeon JS, Carreno-Quintero N, van Eekelen HDLM, De Vos RCH, Raaijmakers JM, Etalo DW (2021) Impact of root-associated strains

- of three *Paraburkholderia* species on primary and secondary metabolism of *Brassica oleracea*. *Sci Rep* 11(1):2781
- Jossier M, Bouly JP, Meimoun P, Arjmand A, Lessard P, Hawley S, Grahame Hardie D, Thomas M (2009) SnRK1 (SNF1-related kinase 1) has a central role in sugar and ABA signalling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 59(2):316–328
- Kulkarni SS, Cantó C (2015) The molecular targets of resveratrol. *Biochim Biophys Acta* 1852:1114–1123
- Lan F, Weikel KA, Cacicedo M, Ido Y (2017) Resveratrol-induced AMP-activated protein kinase activation is cell-type dependent: Lessons from basic research for clinical application. *Nutrients* 9(7):751
- Laurie S, McKibbin RS, Halford NG (2003) Antisense SNF1-related (SnRK1) protein kinase gene represses transient activity of an α -amylase (α -Amy2) gene promoter in cultured wheat embryos. *J Exp Bot* 54(383):739–747
- Lee KW, Chen PW, Lu CA, Chen S, Ho TH, Yu SM (2009) Coordinated responses to oxygen and sugar deficiency allow rice seedlings to tolerate flooding. *Sci Sig* 2(91):ra61
- Liu Z, Zhang G, Huang S, Cheng J, Deng T, Lu X, Oladunni A, Chen Q, Wan X (2020) Induction of apoptosis in hematological cancer cells by dorsomorphin correlates with BAD upregulation. *Biochem Biophys Res Commun* 522(3):704–708
- Lovas A, Bimbo A, Szabo L, Banfalvi Z (2003) Antisense repression of StubGAL83 affects root and tuber development in potato. *Plant J* 33(1):139–147
- Lunn JE, Feil R, Hendriks JH, Gibon Y, Morcuende R, Osuna D, Scheible W-R, Carillo P, Hajirezaei M-R, Stitt M (2006) Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J* 397(1):139–148
- Malamy JE, Benfey PN (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124(1):33–44
- Mayer FV, Heath R, Underwood E, Sanders MJ, Carmena D, McCartney RR, Leiper FC, Xiao B, Jing C, Walker PA, Haire LF, Ogrodowicz R, Martin SR, Schmidt MC, Gamblin SJ, Carling D (2011) ADP regulates SNF1, the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of AMP-activated protein kinase. *Cell Met* 14(5):707–714
- McBride A, Ghilagaber S, Nikolaev A, Hardie DG (2009) The glycogen-binding domain on the AMPK β subunit allows the kinase to act as a glycogen sensor. *Cell Met* 9(1):23–34
- Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue MJ, Foulfelle F, Ferré P, Birnbaum MJ, Stuck BJ, Kahn BB (2004) AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428(6982):569–574
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497
- Nunes C, Primavesi LF, Patel MK, Martinez-Barajas E, Powers SJ, Sagar R, Fevereiro PS, Davis BG, Paul MJ (2013) Inhibition of SnRK1 by metabolites: tissue-dependent effects and cooperative inhibition by glucose 1-phosphate in combination with trehalose 6-phosphate. *Plant Physiol Biochem* 63:89–98
- Oakhill JS, Chen ZP, Scott JW, Steel R, Castelli LA, Ling N, Macaulay L, Kemp BE (2010) β -Subunit myristoylation is the gatekeeper for initiating metabolic stress sensing by AMP-activated protein kinase (AMPK). *Proc Natl Acad Sci USA* 107(45):19237–19241
- Oakhill JS, Steel R, Chen ZP, Scott JW, Ling N, Tam S, Kemp BE (2011) AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science* 332(6036):1433–1435
- Ohto M, Onai K, Furukawa Y, Aoki E, Araki T, Nakamura K (2001) Effects of sugar on vegetative development and floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 127(1):252–261
- Polge C, Thomas M (2007) SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends Plant Sci* 12(1):20–28
- Purcell P, Smith AM, Halford NG (1998) Antisense expression of sucrose non-fermenting-1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose-inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves. *Plant J* 14:195–203
- Rodrigues A, Adamo M, Crozet P, Margalha L, Confraria A, Martinho C, Elias A, Rabissi A, Lumberras V, González-Guzmán M, Antoni R, Rodríguez PL, Baena-González E (2013) ABI1 and PP2CA phosphatases are negative regulators of Snf1-related protein kinase1 signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25(10):3871–3884
- Schluepmann H, Berke L, Sanchez-Perez GF (2012) Metabolism control over growth: a case for trehalose-6-phosphate in plants. *J Exp Bot* 63(9):3379–3390
- Schwachtje J, Minchin PE, Jahnke S, Van Dongen JT, Schittko U, Baldwin IT (2006) SNF1-related kinases allow plants to tolerate herbivory by allocating carbon to roots. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(34):12935–12940
- Scott JW, Hawley SA, Green KA, Anis M, Stewart G, Scullion GA, Norman DG, Hardie DG (2004) CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J Clin Invest* 113(2):274–284
- Seethapalli A, Dhakal K, Griffiths M, Guo H, Freschet GT, York LM (2021) RhizoVision Explorer: open-source software for root image analysis and measurement standardization. *AoB Plants* 13(13):pla056
- Shishodia S, Aggarwal BB (2006) Resveratrol: a polyphenol for all seasons. *Resveratrol Health Dis* 1:1–15
- Simon N, Sawkins E, Dodd AN (2018) Involvement of the SnRK1 subunit KIN10 in sucrose-induced hypocotyl elongation. *Plant Signal Behav* 13(6):e1457913
- 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 Phytol* 201(3):850–861
- Suter M, Riek U, Tuerk R, Schlattner U, Wallimann T, Neumann D (2006) Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 281(43):32207–32216
- Toroser D, Plaut Z, Huber SC (2000) Regulation of a plant SNF1-related protein kinase by glucose-6-phosphate. *Plant Physiol* 123(1):403–411
- Umezawa T, Nakashima K, Miyakawa T, Kuromori T, Tanokura M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2010) Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. *Plant Cell Physiol* 51(11):1821–1839
- Vestergaard M, Ingmer H (2019) Antibacterial and antifungal properties of resveratrol. *Int J Antimicrob Agents* 53(6):716–723
- Wang S, Song P, Zou M-H (2012) AMP-activated protein kinase, stress responses and cardiovascular diseases. *Clin Sci (Lond)* 122(12):555–573
- Weinl S, Kudla J (2009) The CBL-CIPK Ca(2+)-decoding signaling network: function and perspectives. *New Phytol* 184(3):517–528
- Widlund AL, Baur JA, Vang O (2013) mTOR: more targets of resveratrol? *Expert Rev Mol Med* 23(15):e10
- Wu LG, Birch RG (2010) Physiological basis for enhanced sucrose accumulation in an engineered sugarcane cell line. *Funct Plant Biol* 37(12):1161–1174
- Wu Y, Song P, Xu J, Zhang M, Zou MH (2007) Activation of protein phosphatase 2A by palmitate inhibits AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 282(13):9777–9788
- Xiao B, Sanders MJ, Underwood E, Heath R, Mayer FV, Carmena D, Jing C, Walker PA, Eccleston JF, Haire LF, Saiu P, Howell SA, Aasland R, Martin SR, Carling D, Gamblin SJ (2011) Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* 472(7342):230–233

7.3.6. Participación de diferentes isoformas de PLD en la bioestimulación de *Arabidopsis thaliana* por los LPS.

En los resultados mostrados en el capítulo 1, se reportó que la PLD de *Arabidopsis thaliana* responde a los LPS de *Azospirillum baldaniorum* Sp245. Para determinar la isoforma de PLD implicada en el efecto de los LPS sobre *Arabidopsis*, se analizaron cuatro líneas knockout (KO) (α 1, ζ 1, ζ 2 y ϵ) y dos líneas sobreexpresoras (OE) (α 1 y ζ 1), cuyas funciones en el crecimiento y desarrollo vegetal son conocidas. Las plantas se cultivaron en medio MS con y sin la adición de LPS (Figura 1). En ausencia de LPS, y en comparación con las plantas de tipo silvestre (WT), se observó una disminución en la longitud total de las líneas PLD α 1-KO, PLD ζ 1-KO y PLD ζ 2-KO. Por el contrario, las líneas PLD ϵ -KO, PLD α 1-OE y PLD ζ 1-OE presentaron una mayor longitud (Figura 2A). El tratamiento con LPS promovió un aumento en la longitud de las plantas en casi todas las líneas analizadas, con excepción de las líneas PLD ϵ -KO y PLD ζ 1-OE, las cuales mostraron una reducción en su longitud.

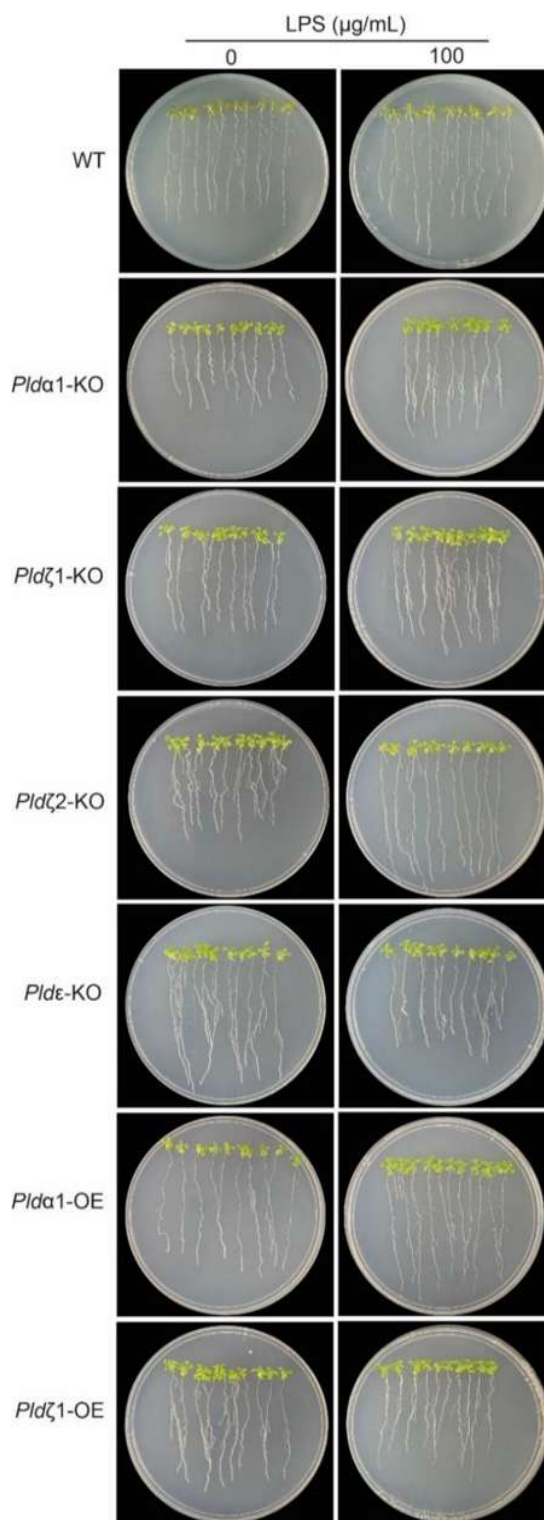


Figura 8. Comparación del crecimiento de plantúlas de las diferentes isoformas de PLD.

Plántulas de 4 días de germinación crecidas en medio MS sin y con LPS (100 µg/mL) durante 7 días.

Con respecto al peso fresco total, la línea PLD ζ 1-KO (Figura 2B) registró el menor peso de las plantas, mientras que en las PLD ζ 1-KO y PLD ζ 2-KO fue similar al de las plantas WT. Por otro lado, las líneas PLD ϵ -KO, PLD α 1-OE y PLD ζ 1-OE mostraron un peso mayor que las WT. Después del tratamiento con LPS, se observó un aumento en el peso fresco total en casi todas las líneas, siendo más significativo en PLD α 1-OE. En la PLD ϵ -KO el peso fue menor. Este comportamiento diferencial sugiere que PLD ϵ podría estar involucrada en un mecanismo de regulación negativa del crecimiento en respuesta a LPS.

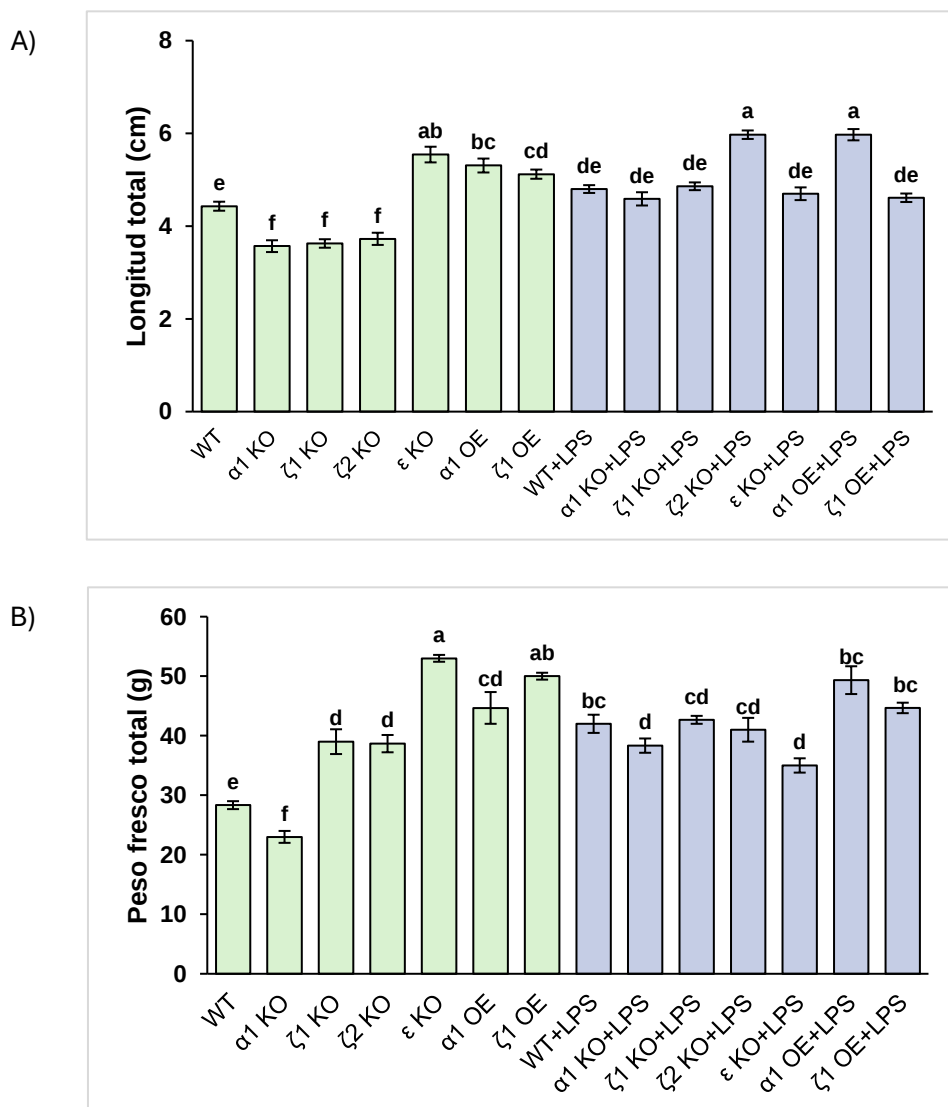


Figura 9. Comparación en los parámetros de crecimiento.

A) Longitud total de la planta (cm). B) Peso fresco total (g). n: 30. ANOVA Tukey α : 0.05.

Debido a que los LPS de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 incrementan la longitud de los pelos radiculares (Capítulo 1), se comparó su efecto en este parámetro radicular. En ausencia de LPS, la longitud de los pelos radiculares fue mayor en todas las líneas en comparación con la WT, con un aumento notable en ambas líneas sobreexpresoras. En contraste, la línea PLD ϵ -KO mostró pelos radiculares más cortos que la WT. El tratamiento con LPS incrementó la longitud de los pelos en PLD ϵ -KO, así como en las sobreexpresoras PLD α 1-OE, y PLD ζ 1-OE pero la disminuyó significativamente en las líneas PLD α 1-KO y PLD ζ 1-KO. Esta reducción sugiere un posible mecanismo de regulación negativa de la longitud de los pelos radiculares mediado por las isoformas α 1 y ζ 1 (Figura 3).

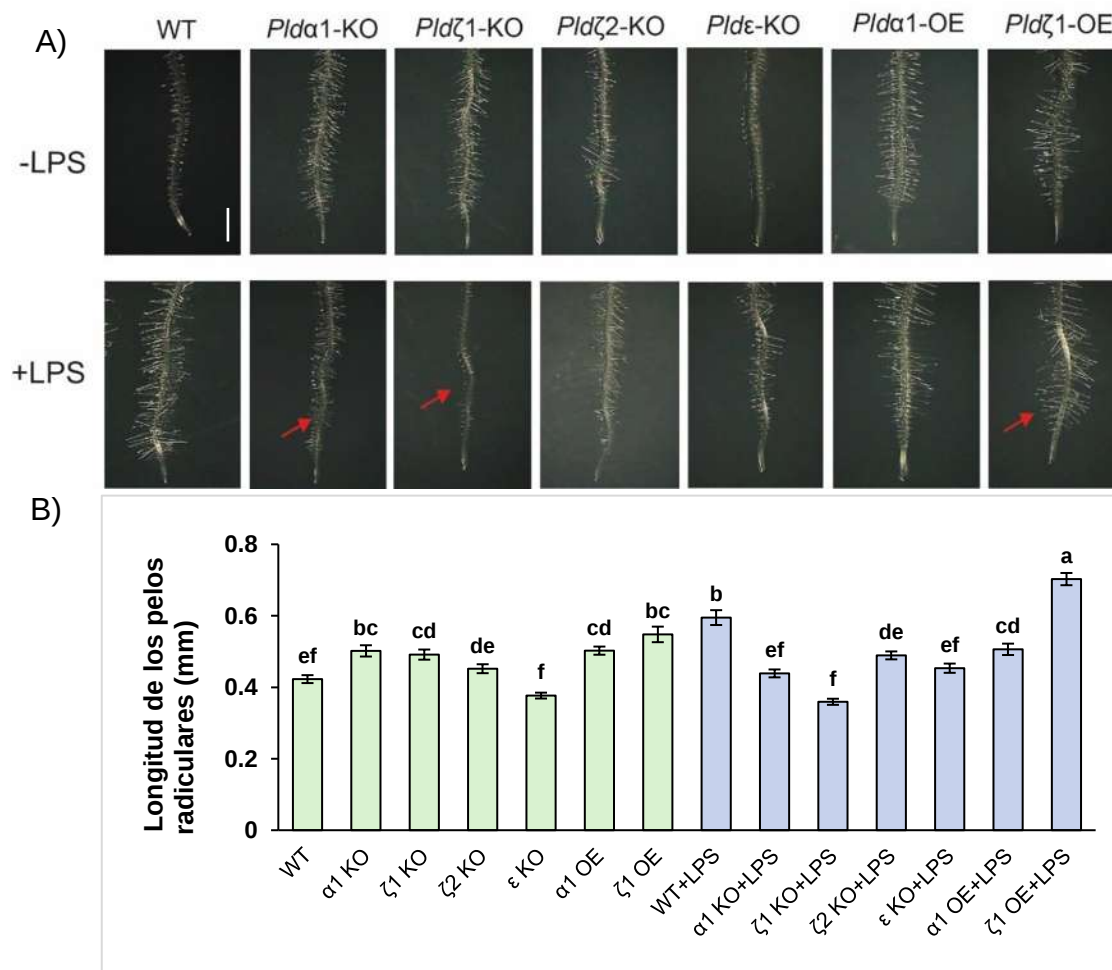


Figura 10. Comparación del efecto de los LPS en el desarrollo de los pelos radiculares de las diferentes isoformas de PLD.

A) Fotografías representativas de raíces de *A. thaliana* de 3 días de germinación y 7 días de crecimiento en medio MS 0.2X y MS con LPS (100 μ g/mL) Barra 1mm. B) Longitud de los pelos radiculares. n:150. ANOVA Tukey α : 0.05.

Además, se cuantificó el contenido de ácido fosfatídico (AF) en las distintas líneas de PLD tratadas con LPS. En general, sin LPS las líneas analizadas mostraron un mayor contenido de AF que la WT, a excepción de la mutante en PLD α 1-KO que registró el nivel más bajo de AF, mientras que su línea sobreexpresora exhibió los niveles más altos (Figura 4). El tratamiento con LPS incrementó el contenido de AF en PLD α 1-KO y lo disminuyó en PLD ζ 2-KO. No se observaron efectos significativos en los niveles de AF en las líneas PLD ζ 1-KO y PLD ϵ -KO, lo que sugiere una posible implicación de estas isoformas en la respuesta a los LPS.

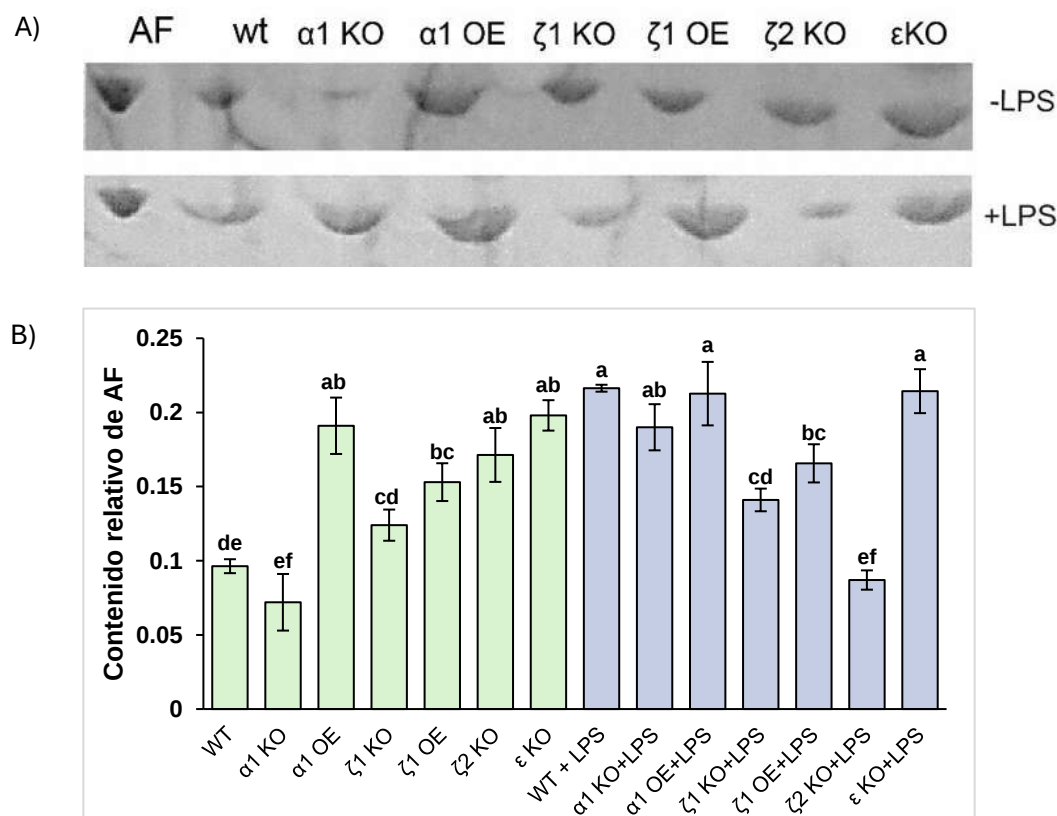


Figura 11. Producción de ácido fosfatídico en las diferentes líneas de PLD.

A) Cromatoplasmas de la producción de ácido fosfatídico en plántulas de las diferentes líneas en PLD con LPS 100 μ g/mL durante 7 días, estándar di18:1-AF, RF:0.17. B) Cuantificación de la producción de ácido fosfatídico por imageJ. n: 3. ANOVA Tukey α : 0.05.

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La enzima PLD se ha implicado en una amplia gama de procesos fisiológicos esenciales para el crecimiento, desarrollo y supervivencia de las plantas. El estudio de plantas con deficiencia o sobreexpresión de isoformas específicas de PLD ha revelado la participación de diferentes PLD en respuestas fisiológicas particulares (Wang et al., 2014). Sin embargo, las PLD han sido poco estudiadas en las interacciones planta-microorganismo (Pacheco y Quinto, 2022).

En la presente investigación, se emplearon líneas deficientes en la expresión de las isoformas $\zeta 1$, $\zeta 2$ y ϵ de la PLD, involucradas en el desarrollo radicular en condiciones de insuficiencia de nutrientes. También se incluyó a la isoforma $\alpha 1$ por ser la más abundante y expresarse en los pelos radiculares, lo que sugiere su posible participación en el desarrollo de estos (Takáč et al., 2019b). En nuestros resultados se observó que las isoformas $\alpha 1$, $\zeta 1$ y $\zeta 2$ de PLD son importantes para el crecimiento vegetal, ya que las líneas mutantes deficientes en estas isoformas presentaron una reducción significativa en la longitud y el peso, mientras que sus sobreexpresoras mostraron un efecto opuesto. Esto coincide con estudios previos que vinculan a la PLD $\alpha 1$ con la expansión celular mediante la modulación de la organización de los microtúbulos, y a las PLD $\zeta 1/\zeta 2$ con respuestas a estrés nutricional, como la carencia de fosfato (Zhang et al., 2017; Li et al., 2006).

El tratamiento con LPS estimuló el crecimiento en todas las líneas analizadas, con excepción de la mutante ϵ , que disminuyó su crecimiento. Esto sugiere que la PLD ϵ podría actuar como un regulador negativo de la respuesta a LPS de *Azospirillum baldaniorum* Sp245, lo cual contrasta con su función positiva en la elongación de la raíz bajo deficiencia de nitrógeno (Hong et al., 2009) demostrando la plasticidad funcional de las PLD dependiendo del contexto fisiológico y los estímulos externos.

Una de las respuestas de las plantas a los LPS es el incremento en la longitud de los pelos radiculares. La PLD, mediante el ácido fosfatídico, desempeña un papel crucial en la expansión polarizada de las células vegetales, incluyendo el crecimiento de los pelos radiculares (Li et al., 2006). Comparando el efecto de los

LPS en la longitud de los pelos radiculares en las diferentes líneas mutantes, se observó que PLD α 1 y PLD ζ 1 parecen esenciales para la elongación inducida por LPS dado que sus mutantes disminuyeron significativamente la longitud de los pelos radiculares. Estudios previos han asociado a PLD ζ 1 con la morfogénesis de pelos radiculares a través de su regulación por el factor de transcripción GLABRA 2 (GL2) (Ohashi et al., 2003). No obstante, el patrón de los pelos radiculares en mutantes simples o dobles de PLD ζ 1 y PLD ζ 2 se mantiene normal (Li et al., 2006), lo que indica que el efecto preciso de las PLD ζ en la organización de estas estructuras aún requiere mayor investigación (Wang et al., 2014).

Se ha reportado que durante la interacción planta-microorganismo ocurre una acumulación de AF en respuesta a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), como la xilanasa, la flagelina, el acetilquitooligosacárido y el quitosano, en células de tomate, alfalfa y arroz (Munnik et al., 2011). Aquí observamos que el tratamiento con LPS estimuló la producción de AF en casi todas las líneas de PLD analizadas, pero no afectó los niveles de AF en las mutantes en ζ 1 y ϵ lo que propone la implicación de estas dos isoformas en el incremento del ácido fosfatídico en respuesta a los LPS. Asimismo, al analizar la producción de AF en condiciones basales encontramos niveles superiores en todas las líneas de plantas, con la excepción de la mutante en α 1, que registró el nivel más bajo. En contraste, su línea sobreexpresora exhibió los niveles más altos de AF, esto indica que esta isoforma es responsable de la mayor parte del ácido fosfatídico producido en condiciones normales.

Las PLD son reguladas por las especies reactivas de oxígeno (ERO), llevando a la producción de AF. Este AF, a su vez, puede modular las respuestas celulares al estrés inducido por las ERO (Zhang et al., 2003). En cultivo de células de arroz el tratamiento con peróxido de hidrogeno (H₂O₂), a concentraciones de 10–100 μ M, estimuló la formación de AF dependiente de PLD (Yamaguchi et al., 2004), mientras que en *Arabidopsis thaliana* la PLD δ se activó en respuesta al H₂O₂. El AF generado por la actividad de PLD δ reduce la muerte celular causada por el incremento de H₂O₂ (Zhang et al., 2003). Por otro lado, en plántulas de trigo los LPS de

Azospirillum baldaniorum Sp245 aumentaron el contenido de H₂O₂ en la raíz, el cual está relacionado con el desarrollo del sistema radicular (Hernández-Esquivel et al., 2020). Se observó que la aplicación de H₂O₂ a concentración de 0.5 y 1 mM indujo cambios morfológicos en *Arabidopsis*, caracterizados por una reducción en la longitud de la raíz primaria y un aumento significativo en la formación y densidad de raíces laterales. Además, se observó un incremento en la expresión de TOR en el meristemo radicular y del gen *RPS27B*, lo que sugiere que el H₂O₂ activa la vía TOR. Sin embargo, no se ha analizado si existe un incremento en la producción de H₂O₂ durante la interacción de los LPS de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 con *Arabidopsis thaliana* y si esta molécula activa a la PLD.

En conclusión, esta investigación sugiere una función de la PLD como activadora de la proteína cinasa TOR durante la estimulación del crecimiento de *Arabidopsis thaliana* por los LPS de la rizobacteria *Azospirillum baldaniorum* Sp245. Los resultados sugieren que las isoformas ζ1 y ε de PLD podrían estar implicadas en esta respuesta, sin embargo, se requieren estudios más profundos que permitan caracterizar con precisión su contribución y su interacción con otros componentes de la red de señalización de TOR, como el H₂O₂. Además, este hallazgo abre la puerta a nuevas investigaciones sobre cómo las especies reactivas de oxígeno son integradas en redes de señalización complejas como la vía TOR para regular el desarrollo y la adaptación de las plantas.

9. LITERATURA CITADA

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

Ali, U., Lu, S., Fadlalla, T., Iqbal, S., Yue, H., Yang, B., Hong, Y., Wang, X., Guo, L. (2022). The functions of phospholipases and their hydrolysis products in plant growth, development and stress response. *Prog. Lipid. Res.* 86:101158. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2022.101158>.

Arisz, S.A., Testerink, C., Munnik, T. (2009). Plant PA signaling via diacylglycerol kinase. *Biochim Biophys Acta.* 9,869-75. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.04.006>.

Askary, M., Mostajeran, A., Amooaghaei, R., Mostajeran, M. (2009). Influence of the co-inoculation *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium meliloti* plus 2,4-D on grain yield and N, P, K content of *Triticum aestivum* (cv. Baccros and Mahdavi). *Am.-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 5 (3): 296-307. ISSN 1818-6769.

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. *Front. Plant Sci.* 9,1473. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>.

Baldani, J. y Baldani, V. (2005). History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *An Acad Bras Cienc* 77,549–579. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652005000300014>.

Bashan, Y. y de-Bashan, L.E. (2010). How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. *Adv Agron* 108,77-136. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(10\)08002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(10)08002-8).

Bedini, E., De Castro, C., Erbs, G., Mangoni, L., Dow, J.M., Newman, M.A., Parrilli, M., Unverzagt, C. (2005). Structure-dependent modulation of a pathogen response in plants by synthetic O-antigen polysaccharides. *J Am Chem Soc.* 8, 2414-6. <https://doi.org/10.1021/ja0452166>. PMID: 15724995.

Beltrán-Peña, E., Aguilar, R., Ortíz-López, A., Dinkova, T.D., De Jiménez, E.S. (2002). Auxin stimulates S6 ribosomal protein phosphorylation in maize thereby affecting protein synthesis regulation. *Physiol. Plantarum* 115, 291-297. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1150216.x>.

Beneduzi, A., Ambrosini, A., Passaglia, M.P. (2012). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR); Their potential as antagonist and biocontrol agents. *Genet. Mol. Biol.* 34, 1049-1051. <https://doi.org/10.1590/s1415-47572012000600020>.

Bhattacharyya, P. N. y Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol.* 28,1327-1350. <http://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>.

Bolognese, C.P. y McGraw, P. (2000). The isolation and characterization in yeast of a gene for *Arabidopsis* S-adenosylmethionine:phospho-ethanolamine N-methyltransferase. *Plant Physiol.* 4,1800-13. <https://doi.org/10.1104/pp.124.4.1800>.

Bottini, R., Cassán, F., Piccoli, P. (2004). Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 5, 497-503. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1696-1>.

Caroff, M. y Novikov, A. (2020). Lipopolysaccharides: structure, function and bacterial identifications. OCL 27, 31. [https://doi.org/ 10.1051/ocl/2020025](https://doi.org/10.1051/ocl/2020025).

Cassán, F. y Diaz-Zorita, M. (2016). *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. Soil Biol. Biochem. 103, 117-130. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.08.020>.

Cassán, F., Coniglio, A., López, G. Molina, R., Nievas, S., Coline, L., Donadio, F., Torres, D., Rosas, S., Olivera Pedrosa, F., de Souza, E., Díaz Zorita, M., Lde-Bashan, L., Mora, V. (2020). Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. Biol Fertil Soils 56, 461-479. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01463-y>.

Chávez- Herrera, E., Hernández- Esquivel, A.A., Castro-Mercado, E., García-Pineda, E. (2018). Effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharides on wheat plant development. J Plant Growth Regul. 37, 859-866. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9782-2>.

Chen, J. y Fang, Y. (2002). A novel pathway regulating the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. Biochem Pharmacol. 7,1071-7. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(02\)01263-7](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(02)01263-7).

Cheng, Z., McConkey, J., Glick, B. (2010). Proteomic studies of plant-bacterial interactions. Soil Biol. Biochem. 42, 1673-1684. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.05.033>.

Choma, A., Russa, R., Lorkiewicz, Z. (1984). Chemical composition of lipopolysaccharide from *Azospirillum lipoferum*. Microbiol. Lett. 22, 245-248. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1984.tb00735.x>.

Choma, A. y Komaniecka, I. (2008). Characterization of a novel lipid A structure isolated from *Azospirillum lipoferum* lipopolysaccharide. Carbohydr. Res. 343, 799-804. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.01.006>.

Cruz-Ramírez, A., López-Bucio, J., Ramírez-Pimentel, G., Zurita-Silva, A., Sánchez-Calderon, L., Ramírez-Chávez, E., González-Ortega, E., Herrera-Estrella, L. (2004). The *xipotl* mutant of *Arabidopsis* reveals a critical role for phospholipid metabolism in root system development and epidermal cell integrity. Plant Cell. 8,2020-34. <https://doi.org/10.1105/tpc.103.018648>.

Cruz-Ramírez, A. Oropeza-Aburto, A., Razo-Hernández, F., Ramírez-Chávez, E., Herrera-Estrella, L. (2006). Phospholipase D ζ 2 plays an important role in extraplastidic galactolipid biosynthesis and phosphate recycling in *Arabidopsis* roots. Proc Natl Acad Sci. 17,6765-70. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600863103>.

Datko, A.H., y Mudd, S.H. (1988). Phosphatidylcholine synthesis: Differing Patterns in Soybean and Carrot, Plant Physiol. 88, 854-861 <https://doi.org/10.1104/pp.88.3.854>.

Deepika D. y Singh, A. (2021): Plant phospholipase D: novel structure, regulatory mechanism, and multifaceted functions with biotechnological application. Crit Rev Biotechnol. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1924113>.

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 Rep. 8, 864-870. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401043>.

Den Hartog, M., Verhoef, N., Munnik T. (2003) Nod factor and elicitors activate different phospholipid signaling pathways in suspension-cultured alfalfa cells. Plant Physiol. 1, 311-7 <https://doi.org/10.1104/pp.102.017954>.

De Virgilio, C y Loewith, R. (2006). The TOR signalling network from yeast to man. *Int J Biochem Cell Biol.* 9, 1476-81. [https:// doi.org/10.1016/j.biocel.2006.02.013](https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.02.013).

Desaki, Y., Kouzai, Y., Ninomiya, Y., Iwase, R., Shimizu, Y., Seko, K., Molinaro, A., Minami, E., Shibuya, N., Kaku, H., Nishizawa, Y. (2018). OsCERK1 plays a crucial role in the lipopolysaccharide-induced immune response of rice. *New Phytol.* 3,1042-1049. [http://doi.org/ 10.1111/nph.14941](http://doi.org/10.1111/nph.14941).

Díaz-Franco, A. y Ortegón, M. A. (2006). Efecto de la inoculación con *Azospirillum brasilense* y fertilización química en el crecimiento y rendimiento de canola (*Brassica napus*). *Rev. Fitotec. Mex.* 3,63-67. ISSN: 0187-7380.

Distéfano, A.M., Scuffi, D., García-Mata, C., Lamattina, L., Laxalt, A.M. (2012). Phospholipase D δ is involved in nitric oxide-induced stomatal closure. *Planta.* 6,1899-907. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1745-4>.

Dos Santos Ferreira, N., Hayashi Sant' Anna, F., Massena Reis, V., Ambrosini, A., Gazolla Volpiano, C., Rothballer, M., Schwab, S., Baura, V.A., Balsanelli, E., Pedrosa, F.O., Pereira Passaglia, L.M., Maltempo de Souza, E., Hartmann, A., Cassán, F., Zilli, J.E. (2020). Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 70,6203-6212. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004517>.

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. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114648>.

Düvel, K., Yecies, J. L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A. I., Souza, A. L., Triantafellow, E., Ma, Q., Gorski, R., Cleaver, S., Vander Heiden, M.G., MacKeigan, J.P., Finan, P.M., Clish, C.B., Murphy, L.O., Manning, B.D. (2010). Activation of a

metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. Mol. Cell. 39, 171-183. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.06.022>.

Erbs, G. y Newman, M.A. (2012). The role of lipopolysaccharide and peptidoglycan, two glycosylated bacterial microbe-associated molecular patterns (MAMPs), in plant innate immunity. Mol Plant Pathol. 1,95-104. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00730.x>.

Evseeva, N.V., Matora, L.Y., Burygin, G.L., Dmitrienko, V.V., Schchyogoley, 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>.

Evseeva, N.V., Tkachenko, O.V., Burygin, G.L., Matora, L.Y., Lobachev, Y.V., Shchyogolev, S.Y. (2018). Effect of bacterial lipopolysaccharides on morphogenetic activity in wheat somatic calluses. World J Microbiol Biotechnol 34, 3. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2386-3>.

Fang, Y., Vilella-Bach, M., Bachamann, R., Flanigan, A., Chen, J. (2001). Phosphatidic Acid-Mediated Mitogenic Activation of mTOR signaling. Sci. 294,1942-1945. <https://doi.org/10.1126/science.1066015>.

Fedonenko, Y.P., Zatonsky, G.V., Konnova, S.A., Zdrovenko, E.L., Ignatov, V. V. (2002). Structure of the O-specific polysaccharide of the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* Sp245. Carbohydr. Res. 337, 869-872. [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(02\)00061-7](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(02)00061-7).

Fernandes Duarte, D. C., Cecato, U., Biserra, T. T., Mamédio, D., Galbeiro, S. (2020). *Azospirillum* spp. en gramíneas y forrajeras. Revisión. Rev Mex Cienc Pecu. 1, 223-240. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i1.4951>.

Floc'h, J.B., Hamel, C., Lupwayi, N., Harker, K.N., Hijri, M and St-Arnaud M. (2020). Bacterial Communities of the Canola Rhizosphere: Network Analysis Reveals a Core Bacterium Shaping Microbial Interactions. *Front. Microbiol.* 1,1587. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01587>.

Foster, D.A. (2013). Phosphatidic acid and lipid-sensing by mTOR. *Trends Endocrinol Metab* 24, 272-278. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.02.003>.

Frank, W., T. Munnik, K. Kerkmann, F. Salamini, D. Bartles. (2000). Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Cell.* 12,111-123. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.1.111>.

Fu, L., Wang, P., Xiong, Y. (2020). Target of rapamycin signaling in plant stress responses. *Plant Physiol.* 182, 1613-1623. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01214>.

García-Olivares, J. G., Moreno-Medina, Víctor. R., Rodríguez-Luna, I., C.; Mendoza Herrera, A. Mayek-Pérez, N. (2007). Efecto de cepas de *Azospirillum brasilense* en el crecimiento y rendimiento de grano del maíz. *Rev. Fitotec. Mex.* 30, 305 – 310. ISSN: 0187-7380.

Gardiner, J.C., Harper, J.D., Weerakoon, N.D., Collings, D.A., Ritchie, S., Gilroy, S., Cyr, R.J., Marc, J. (2013). A 90-kD phospholipase D from tobacco binds to microtubules and the plasma membrane. *Plant Cell.* 9, 2143-58. <https://doi.org/10.1105/tpc.010114>.

Ghosh, A., Acharya, R., Shaw, S y Gangopadhyay, D. (2024). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): A Potential Alternative Tool for Sustainable Agriculture. *Updates on Rhizobacteria.* Cap. 4. <https://doi.org/10.5772/intechopen.1004252>.

Gibellini, F. y Smith, T.K. (2010). The Kennedy pathway--De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life*. 6, 414-28. <https://doi.org/10.1002/iub.337>.

Guo, L., Devaiah, S.P., Narasimhan, R., Pan, X., Zhang, Y., Zhang, W., Wang, X. (2012). Cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases interact with phospholipase D δ to transduce hydrogen peroxide signals in the *Arabidopsis* response to stress. *Plant Cell*. 5, 2200-12. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.094946>.

Hanahan, D.J y Chaikoff, I.L. (1947). A new phospholipide-splitting enzyme specific for the ester linkage between the nitrogenous base and the phosphoric acid grouping. *J Biol Chem*. 3, 699-705. PMID: 20259103.

Heitman, J., Movva, N.R., Hall, M.N. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Sci*. 253, 905-909. <https://doi.org/10.1126/science.1715094>.

Hernández-Esquivel, A.A, Castro-Mercado, E., García-Pineda, E. (2020). Comparative effects of *Azospirillum brasilense* Sp245 and *Pseudomonas aeruginosa* PA01 lipopolysaccharides on wheat seedling growth and peroxidase activity. *J Plant Growth Reg* 40,1903-1911. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10241-x>.

Hernández-Esquivel, A.A., Castro-Mercado, E., Valencia-Cantero, E., Alexandre, G., García-Pineda, E. (2020). Application of *Azospirillum brasilense* Lipopolysaccharides to Promote Early Wheat Plant Growth and Analysis of Related Biochemical Responses. *Front Sust Food Syst*. 4,579976. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.579976>.

Hernández-Esquivel, A.A., Torres-Olmos, J.A., Méndez-Gómez, M., Castro-Mercado, E., Flores-Cortéz, I., Peña-Urbe, C.A., Campos-García, J., López-Bucio, J., Reyes-de la Cruz, H., Valencia-Cantero, E., García-Pineda, E. (2024). Hydrogen

peroxide modulates the expression of the target of rapamycin (TOR) and cell division in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma*. 6,1147-1158. <https://doi.org/10.1007/s00709-024-01959-6>.

Hong, Y., Pan, X., Welti, R., Wang, X. (2008). Phospholipase D α 3 is involved in the hyperosmotic response in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 3,803–16. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.056390>.

Hong, Y., Devaiah, S.P., Bahn, S.C., Thamasandra, B.N., Li, M., Welti, R., Wang, X. (2009). Phospholipase D epsilon and phosphatidic acid enhance *Arabidopsis* nitrogen signaling and growth. *Plant J*. 3, 376-87. <https://doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03788.x>.

Janse van Rensburg, H.G., Van den Ende, W., Signorelli, S. (2019). Autophagy in plants: both a puppet and a puppet master of sugars. *Frontiers in Plant Science* 10, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00014>.

Kloepper, J. y Schroth, M.N. (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. IV international conference on plant pathogenic bacteria. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1573387450264426624>.

Krishnamurthy, K. V., Bahadur, Bir., John A, S. y Venkatasubramanian, P. (2015). Meristems and Their Role in Primary and Secondary Organization of the Plant Body. *Plant Biol and Biotechnol*. Ed, 1, Cap.4. 113-151. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2286-6_4.

Knirel, Y.A., Valvano, M.A. (2011). Bacterial lipopolysaccharides: Structure, chemical synthesis, biogenesis and interaction with host cell. Springer Wien New York. ISBN 978-3-7091-0732-4 e-ISBN 978-3-7091-0733-1 <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0733-1>.

Kolesnikov, Y., Kretynin S., Bukhonska, Y., Pokotylo, I., Ruelland, E., Martinec, J., Kravets, V. (2022). Phosphatidic Acid in Plant Hormonal Signaling: From Target Proteins to Membrane Conformations. *Int J Mol Sci.* 6,3227. <https://doi.org/10.3390/ijms23063227>.

Kusner, D.J., Barton, J, A., Wen, K.K., Wang, X., Rubenstein, P.A, Iyer, S.S. (2002). Regulation of phospholipase D activity by actin. Actin exerts bidirectional modulation of Mammalian phospholipase D activity in a polymerization-dependent, isoform-specific manner. *J Biol Chem.* 277,50683-50692. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209221200>.

Kutschera, A. y Ranf, S. (2018). The multifaceted functions of lipopolysaccharide in plant-bacteria interactions. *Biochimie.* 159, 93-98. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.07.028>.

Islam, M.Z., Sattar, M.A., Ashrafuzzaman, M., Saud, H.M., Uddin, M.K. (2012). Improvement of yield potential of rice through combined application of biofertilizer and chemical nitrogen. *Afr. J. Microbiol. Res.* 4, 745e750. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.859>.

Leeman, M., van Pelt, J.A., den Ouden, F.M., Heinsbroek, M., Bakker, P. A. H. M y Schippers, B. (1995). Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to *fusarium* wilt, using a novel bioassay. *Eur J Plant Pathol.* 101, 655-664 <https://doi.org/10.1007/BF01874869>.

Li, W, Li, M., Zhang, W., Welti, R., Wang, X. (2004). The plasma membrane-bound phospholipase D δ enhances freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol.* 4, 427-33. <https://doi.org/10.1038/nbt949>.

Li, M., Qin, C., Welti, R., Wang, X. (2006). Double knockouts of phospholipases D ζ 1 and D ζ 2 in *Arabidopsis* affect root elongation during phosphate-limited growth but

do not affect root hair patterning. *Plant Physiol.* 2,761-70. <https://doi.org/10.1104/pp.105.070995>.

Li, G. y Xue, H.W. (2007). *Arabidopsis* PLD ζ 2 regulates vesicle trafficking and is required for auxin response. *Plant Cell*.1,281-95. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.041426>.

Li, M., Hong, Y., Wang, X. (2009). Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants. *Biochim. Biophys. Acta.* 1791, 927-935. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.02.017>.

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

Li, J. y Wang, X. (2019). Phospholipase D and phosphatidic acid in plant immunity. *Plant Sci.* 279,45-50. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.05.021>.

LPS Analysis Service. (2025, 9 de abril). Creative Biolabs. Immuno-Oncology. <https://www.creative-biolabs.com/immuno-oncology/lps-analysis-service.htm>.

Liu, Y y Xiong, Y. (2022). Plant target of rapamycin signaling network: Complexes, conservations, and specificities. *J Integr Plant Biol.* 2, 42-370. <https://doi.org/10.1111/jipb.13212>.

Maffucci, T. y Falasca, M. (2001). Specificity in pleckstrin homology (PH) domain membrane targeting: a role for a phosphoinositide-protein co-operative mechanism. *FEBS Lett.* 506, 173–179. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02909-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02909-X).

Marshall, R.S., Vierstra, R.D. (2018). Autophagy: the master of bulk and selective recycling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 69, 173-208. <https://doi.org/10.1146/annurevarplant-042817-040606>.

McCready, K., Spencer, V., Kim, M. (2020). The importance of TOR kinase in plant development. *Front. Plant Sci.* 11, 16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00016>.

McGee, J.D., Roe, J.L., Sweat, T.A., Wang, X., Guikema, J.A., Leach, J.E. (2003) Rice phospholipase D isoforms show differential cellular location and gene induction. *Plant Cell Physiol.* 44,1013-1026. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcg125>.

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. <https://doi.org/10.1073/pnas.092141899>.

Méndez-Gómez, M., Castro-Mercado, E., Peña-Urbe, C.A., Reyes-De la Cruz, H., López-Bucio J., García-Pineda E. (2020). *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharides induce target of rapamycin signaling and growth in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol.* 253,153270. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153270>.

Mishina, T.E. y Zeier, J. (2007). Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant J.* 3, 500-13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03067.x>.

Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H., Shibuya, N. (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 49,19613-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705147104>.

Montaño-Pérez, F., Villegas-Alías, C., Belloín, R.A, Del cerro, P., Espuny, M.R., Guerrero-Jiménez, I., Baena-López, F.J., Ollero, F.J., Cubo, I. (2014). Plant growth microorganism capacities to crop production. *Microbiol Res.* 169, 325-336. [https://doi.org/ 10.1016/j.micres.2013.09.011](https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.011).

Morales-Ascencio, C., Castro-Mercado, E., García-Pineda, E. 2019. Effect of lipopolysaccharides from *Azospirillum brasilense* on the growth of cucumber plants. *Nicolaita Science.* 78, 75-86. <https://doi.org/10.35830/cn.vi78.469>.

Munnik, T., Arisz, S.A., De Vrije, T., Musgrave, A. (1995). G Protein Activation Stimulates Phospholipase D Signaling in Plants. *Plant Cell.* 12, 2197-2210. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.12.2197>.

Munnik, T., Irvine, R.F., Musgrave, A. (1998). Phospholipid signalling in plants. *Biochim Biophys Acta.* 3,222-72. [https://doi.org/10.1016/s0005-2760\(97\)00158-6](https://doi.org/10.1016/s0005-2760(97)00158-6).

Munnik, T. (2001). Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends Plant Sci.* 5,227-33. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(01\)01918-5](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(01)01918-5).

Nanjareddy, K., Blanco, L., Arthikala, M.-K., 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 Physiol.* 172, 2002-2020. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00844>.

Nakazawa, Y., Sagane, Y., Sakurai, S., Uchino, M., Sato, H., Toeda, K., Takano, K. (2011). Large-scale production of phospholipase D from *Streptomyces racemochromogenes* and its application to soybean lecithin modification. *Appl Biochem Biotechnol.* 8,1494-506. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9370-4>.

Nakamura, Y., Koizumi, R., Shui, G., Shimojima, M., Wenk, M. R., Ito, T. and Ohta, H. (2009). *Arabidopsis* lipins mediate eukaryotic pathway of lipid metabolism and

cope critically with phosphate starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 20978-20983. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907173106>.

Novák, D., Vadovič, P., Ovečka, M., Šamajová, O., Komis, G., Colcombet, J., Šamaj, J. (2018). Gene expression pattern and protein localization of *Arabidopsis* phospholipase D alpha 1 revealed by advanced light-sheet and super-resolution microscopy. *Front. Plant Sci.* 9, 1–21. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00371>.

Ohashi, Y., Oka, A., Rodrigues-Pousada, R., Possenti, M., Ruberti, I., Morelli, G., Aoyama, T. (2003). Modulation of phospholipid signaling by GLABRA2 in root-hair pattern formation. *Sci.* 30;300(5624),1427-30. <https://doi.org/10.1126/science.1083695>.

Otsubo, Y., Yamashita, A., Ohno, H., Yamamoto, M. (2014) *S. pombe* TORC1 activates the ubiquitin-proteasomal degradation of the meiotic regulator Mei2 in cooperation with Pat1 kinase. *J Cell Sci.* 12, 2639-46. <https://doi.org/10.1242/jcs.135517>.

Pacheco, R. y Quinto, C. (2022). Phospholipase Ds in plants: Their role in pathogenic and symbiotic interactions. *Plant Physiol Biochem.* 173, 76-86. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.01.025>.

Pedraza, R. O., Filippone, M. P., Fontana, C., Salazar, S. M., Ramírez-Mata, A., Sierra-Cacho, D., Baca, B. E. (2020). Chapter 6 – *Azospirillum*. Beneficial Microbes in Agro-Ecology. Academic Press. 73-105. ISBN 9780128234143, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00006-X>.

Peterson, T. R., Sengupta, S. S., Harris, T. E., Carmack, A. E., Kang, S. A., Balderas, E., Guertin, D. A., Madden, K. L., Carpenter, A. E., Finck, B. N., Sabatini, D.M. (2011). mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell* 146, 408-420. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.034>.

Potocký, M., Eliás, M., Profotová, B., Novotná, Z., Valentová, O., and Zárský, V. (2003). Phosphatidic acid produced by phospholipase D is required for tobacco pollen tube growth. *Planta*. 217,122-130. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0965-4>.

Qin, C. y Wang, X. (2002). The *Arabidopsis* phospholipase D family. Characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholine-selective PLD zeta 1 with distinct regulatory domains. *Plant Physiol*. 128(3):1057-68. <https://doi.org/10.1104/pp.010928>.

Rabeh, K., Oubohssaine, M., Hnini, M. (2024). TOR in plants: Multidimensional regulators of plant growth and signaling pathways. *J Plant Physiol*. 294,154186. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2024>.

Ranf, S., Gich, N., Schäffer, M., Illig, T., Westphal, L., Knirel, Y.A. (2015). A lectin S-domain receptor kinase mediates lipopolysaccharide sensing in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Immunol*. 16, 426-33. <http://doi.org/10.1038/ni.3124>.

Ranf, S. (2016). Immune Sensing of Lipopolysaccharide in Plants and Animals: Same but Different. *Plos Pathog*. 6, e1005596. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005596>.

Reis, V.M., Baldani, V.L.D., Baldani, J.I. (2015). Isolation, identification and biochemical characterization of *Azospirillum* spp., and other nitrogen-fixing bacteria. In: Cassán FD, Okon Y, Creus CM (eds). *Handbook for Azospirillum*. Springer, International Publishing, Switzerland, 3-26. https://doi.org/10.1007/978-3-319-06542-7_1.

Reitz, M., Rudolph, K., Schröder, I., Hoffmann-Hergarten, S., Hallmann, J. y Sikora, R.A. (2000). Lipopolysaccharides of *Rhizobium etli* strain G12 act in potato roots as

an inducing agent of systemic resistance to infection by the cyst nematode *Globodera pallida*. Appl Environ Microbiol. 8, 3515-8. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3515-3518.2000>.

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

Renukadevi, K.P., 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. 29, 97-101. ISSN 2067-3809.

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

Scarpin, M.R., Leiboff, S., Brunkard, J.O. (2020). Parallel global profiling of plant TOR dynamics reveals a conserved role for LARP1 in translation. Elife 9, e58795. <https://doi.org/10.7554/eLife.58795>.

Schepetilnikov, M., Dimitrova, M., Mancera-Martínez, E., Geldreich, A., Keller, M., Ryabova, L.A. (2013). TOR and S6K1 promote translation reinitiation of uORF-containing mRNAs via phosphorylation of eIF3h. EMBO J. 32, 1087-102. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.61>.

Seet, L.F. y Hong, W. (2006). The Phox (PX) domain proteins and membrane traffic. Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids. 1761, 878–896. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.04.011>.

Sehgal, S. N., Baker, H. and Vezina, C. (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. J. Antibiot. 28, 727-732. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.28.727>.

Shi, L., Wu, Y., Sheen, J. (2018). TOR signaling in plants: conservation and innovation. Development. 145, dev160887. <https://doi.org/10.1242/dev.160887>.

Shiu, S.H. y Bleecker, A.B. (2003). Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 2, 530-43. <https://doi/10.1104/pp.103.021964>.

Sigida, E.N., Fedonenko, Y.P., Shashkov, A.S., Zdorovenko, E.L., Konnova, S.A., Ignatov, V.V., Knirel, Y.A. (2013). Structural studies of the O-specific polysaccharide(s) from the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* type strain Sp7, Carbohydr. Res. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres>.

Signorelli, S., Masclaux-Daubresse, C., Moriyasu, Y.J., Van-den-Ende, W., Bassham-Diane, C. (2019). Editorial: sugars and autophagy in plants. Frontiers in Plant Science 10, 1190. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01190>.

Silipo, A., De Castro, C., Lanzetta, R., Parrilli, M., Molinaro, A. (2010). Lipopolysaccharides. In: König H, Claus H, Varma A (eds) Prokaryotic cell wall compounds – structure and biochemistry. Springer, Heidelberg, pp 133-154. https://doi.org/10.1007/978-3-642-05062-6_4.

Silipo, A y Molinaro, A. (2011). Lipid A Structure. Bacterial lipopolysaccharides: Structure, Chemical synthesis, Biogenesis and Interaction with Host Cell. Springer Wien New York. Cap 1,1-20. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0733-1>.

Song, Y., Li, L., Yang, Zhaoen, Zhao, G., Zhang, X., Wang, L., Zheng, L., Zhuo, F., Yin, H., Ge, X., Zhang, C., Yang, Zuoren, Ren, M., Li, F., (2019). Target of rapamycin

(TOR) regulates the expression of lncRNAs in response to abiotic stresses in cotton. *Front. Genet.* 9, 690. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00690>.

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*. 31215-23. <http://doi.org/10.1007/s11104-008-9560-1>.

Stuckey, J.A., Dixon, J.E. (1999). Crystal structure of a phospholipase D family member. *Nat Struct Biol.* 6,278-284. <https://doi.org/10.1038/6716>.

Suttangkakul, A., Li, F., Chung, T. and Vierstra, R. D. (2011). The ATG1/ATG13 protein kinase complex is both a regulator and a target of autophagic recycling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 23, 3761-3779. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.090993>.

Tanaka, T., Kassai A., Ohmoto, M., Morito, K., Kashiwada, Y., Takaishi, Y., Urikura, M., Morishige, J., Satouchi, K and Tokumura, A. (2012). Quantification of phosphatidic Acid in Foodstuffs Using a Thin- Layer -Chromatography-Imaging Technique. *J. Agric. Food. Chem.* 60,4156-4161. <https://doi.org/10.1021/jf300147y>.

Takáč, T., Pechan, T., Šamajová, O., Šamaj, J. (2019a) Proteomic Analysis of *Arabidopsis pldα1* Mutants Revealed an Important Role of Phospholipase Dα1 in Chloroplast Biogenesis. *Front Plant Sci.* 10,89. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00089>.

Takáč, T., Novák, D. and Šamaj, J. (2019b). Recent Advances in the Cellular and Developmental Biology of Phospholipases in Plants. *Front. Plant Sci.* 10, 362. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00362>.

Teale, W.D., Paponov, I.A., Palme, K., (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 847-859. <https://doi.org/10.1038/nrm2020>.

Testerink, C., Munnik, T., (2011). Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. *J. Exp. Bot.* 62, 2349-2361. <https://doi.org/10.1093/jxb/err079>.

Tkachenko, O.V., Burygin, G.L., Evseeva, N.V., Fedoneko, Y.P., Matora, L.Y., Lobachev Y.V., Shchyogolev, S.Y. (2021). Morphogenesis of wheat calluses treated with *Azospirillum* lipopolysaccharides. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 147, 147-155. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02114-2>.

Turck, F., Zilbermann, F., Kozma, S.C., Thomas, G., Nagy, F. (2004). Phytohormones participate in an S6 kinase signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134, 1527-1535. <https://doi.org/10.1104/pp.103.035873>.

Uraji, M., Katagiri, T., Okuma, E., Ye, W., Hossain, M.A., Masuda, C., Miura, A., Nakamura Y., Mori, I.C., Shinozaki, K., Murata, Y. (2012). Cooperative function of PLD δ and PLD α 1 in abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 159, 450-460. <https://doi.org/10.1104/pp.112.195578>.

Vadovič, P., Šamajová, O., Takáč, T., Novák, D., Zapletalová, V., Colcombet, J., Šamaj, J. (2019). Biochemical and Genetic Interactions of Phospholipase D Alpha 1 and Mitogen-Activated Protein Kinase 3 Affect *Arabidopsis* Stress Response. *Front Plant Sci.* 10, 275. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00275>.

Van Leene, J., Han, C., Gadeyne, A. (2019). Capturing the phosphorylation and protein interaction landscape of the plant TOR kinase. *Nature Plants* 5, 316-327. [doi:10.1038/s41477-019-0378-z](https://doi.org/10.1038/s41477-019-0378-z).

Villa-Castro, L., Mayek-Pérez, N., García-Olivares, J. G. y Hernández-Mendoza, J. L. (2014). Efecto de la inoculación en maíz con cepas nativas de *Azospirillum* sp. *Aia.* 1, 33-38 ISSN: 0188789-0.

Vocciante, M., Grifoni, M., Fusini, D., Petruzzelli, G., y Franchi, E. (2022). The Role of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) in Mitigating Plant's Environmental Stresses. *Appl. Sci.* 3, 1231. <https://doi.org/10.3390/app12031231>.

Wang, X., Xu, L., Zheng, L. (1994). Cloning and expression of phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase D from *Ricinus communis* L. *J Biol Chem* 269, 20312-20317. PMID: 8051126.

Wang, C. y Wang, X. (2001). A novel phospholipase D of *Arabidopsis* that is activated by oleic acid and associated with the plasma membrane. *Plant Physiol.* 3,1102-12. PMID: 11706190; PMCID: PMC129279.

Wang, X. (2005). Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses. *Plant Physiol.* 139, 566-573. <https://doi.org/10.1104/pp.105.068809>.

Wang, X., Guo, L., Wang, G. y Li, M. (2014). PLD: Phospholipase Ds in Plant Signaling. In: Wang, X. (eds). *Phospholipases in Plant Signaling*. 20, 3-26 https://doi.org/10.1007/978-3-642-42011-5_1.

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

Watanabe, Y. y Yamamoto, M. (2004). *S. pombe* mei2⁺ encodes an RNA-binding protein essential for premeiotic DNA synthesis and meiosis I, which cooperates with a novel RNA species meiRNA. *Cell.* 3,487-98. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90426-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90426-x).

Welti R., Li W., Li H., Sang Y., Biesiada H., Zhou H., Rajashekar C. B., Williams T. D and Wang X. (2002). Profiling membrane lipids in plant stress responses. *J. biol. Chem.* 277, 31994-32002. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205375200>.

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

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

Yamaguchi, T., Tanabe, S., Minami, E., Shibuya, N. (2004). Activation of phospholipase D induced by hydrogen peroxide in suspension-cultured rice cells. *Plant Cell Physiol.* 45, 1261-1270. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch150>.

Yoon, M.S., Rosenberger, C.L., Wu, C., Truong, N., Sweedler, J.V., Chen, J. (2015). Rapid mitogenic regulation of the mTORC1 inhibitor, DEPTOR, by phosphatidic acid. *Mol Cell.* 3, 549-56. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.03.028>.

Yu, L., Nie, J., Cao, C., Jin, Y., Yan, M., Wang, F., Liu, J., Xiao, Y., Liang, Y., Zhang, W. (2010). Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 3, 762-73. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03422.x>.

Yuan, X., Wang, Z., Huang, J., Xuan, H., Gao, Z. (2019). Phospholipidase D δ Negatively Regulates the Function of Resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *Maculicola* 1 (RPM1). *Front Plant Sci.* 9, 1991. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01991>.

Zhang, W., Wang, C., Qin, C., Wood, T., Olafsdottir, G., Welti, R., Wang, X. (2003). The oleate-stimulated phospholipase D, PLD δ , and phosphatidic acid decrease

H₂O₂-induced cell death in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 10, 2285-95. <https://doi.org/10.1105/tpc.013961>.

Zhang, W., Qin, C., Zhao, J., Wang X. (2004). Phospholipase D α 1 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25, 9508-13. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402112101>.

Zhang, Q., Qu, Y., Wang, Q., Song, P., Wang, P., Jia, Q., Guo, J. (2017). *Arabidopsis* phospholipase D α 1-derived phosphatidic acid regulates microtubule organization and cell development under microtubule-interacting drugs treatment. *J Plant Res*. 1, 193-202. <https://doi.org/10.1007/s10265-016-0870-8>.

Zhao, J. y Wang, X. (2004). *Arabidopsis* phospholipase D α 1 interacts with the heterotrimeric G-protein α -subunit through a motif analogous to the DRY motif in G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem*. 3, 1794-800. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309529200>.

Zhao, J., Devaiah, S.P., Wang, C., Li, M., Welte, R., Wang, X. (2013). *Arabidopsis* phospholipase D β 1 modulates defense responses to bacterial and fungal pathogens. *New Phytol*. 1, 228-240. <https://doi.org/10.1111/nph.12256>

Zhao, Y. y Wang, X.Q. (2022). In Silico analysis of *Vitis vinifera* Cabernet Sauvignon TOR and its responses to sugar and abscisic acid signaling. *Acta Bot. Bras*. 36 <https://doi.org/10.1590/0102-33062020abb0482>.

Zhou, H., Huo, Y., Yang, N., Wei, T. (2024). Phosphatidic acid: from biophysical properties to diverse functions. *FEBS J*. 9, 1870-1885. <https://doi.org/10.1111/febs.16809>.

Zien, C. A., C. Wang., X. Wang, and R. Welti. (2001). In vitro substrates and the contribution of the common phospholipase D, PLD α to wound-induced metabolism of lipids in *Arabidopsis*. Biochim. Biophys. Acta. 1530, 236-248. [https:// doi.org/10.1016/s1388-1981\(01\)00091-9](https://doi.org/10.1016/s1388-1981(01)00091-9).

10. APÉNDICE

Protocolo 1. Extracción de lipopolisacáridos de *Azospirillum baldaniorum* Sp245

Materiales y equipo:

- Tetraciclina
- Fenol equilibrado con Tris-HCL, pH 8.0
- Alcohol absoluto
- Agua destilada estéril
- Acetato de Sodio 3 M
- RNasa A
- DNasa I
- Proteinasa K
- Tubos de cristal con tapa metálica
- Matraz Erlenmeyer 250 mL
- Vaso de precipitados 500 mL
- Probeta 50 mL
- Tubos Falcon 50 mL
- Tubos Eppendorf
- Hilo
- Membrana para dializar (Flat width 33 mm)
- Varilla
- Bala magnética (mosca de agitación)
- Micropipeta 1000 µL y 100 µL
- Puntas para micropipeta (azules y amarillas)
- Incubadora (Cámara de calor seco)
- Centrifuga Central CL
- Centrifuga Eppendorf

Procedimiento:

1. Crecimiento bacteriano

1.1. Para el preinóculo, agregar en un tubo de ensayo 3 mL de LB mínimo (LBm) con el antibiótico tetraciclina (Tc) a una concentración de 10 µg/mL e inocular una colonia de la cepa bacteriana: *Azospirillum baldaniorum* Sp245.

1.1.1. Incubar por 16 horas a 30°C en agitación constante. No olvidar el control negativo (un tubo de ensayo solo con 3ml de medio mínimo LB).

1.2. Para el inóculo, en un matraz Erlenmeyer agregar 200 mL de medio de cultivo LBm con TC 10 µg/mL e inocular 300 µL del preinóculo.

1.2.1. Incubar por 24 horas a 30°C en agitación constante. No olvidar el control negativo (un matraz Erlenmeyer solo con 100ml de medio LBm).

1.2.2. Medir densidad óptica.

2. Obtención de un solo paquete celular

2.1. Colocar el cultivo en 4 tubos Falcón (50 mL en cada tubo).

2.2. Centrifugar el cultivo a 3200 rpm (Usar la centrífuga CENTRA CL) x 10 minutos.

2.3. Eliminar 15 mL de sobrenadante, dejando 10 mL de medio para resuspender (en el vortex) el paquete celular.

2.4. Juntar los paquetes celulares en un solo tubo Falcón (40 mL de volumen final).

2.5. Centrifugar a 3200 rpm x 5min más (No olvidar el contrapeso para centrifugar: otro tubo Falcón con un volumen de agua igual que el del cultivo 40 mL).

*Si se desea conocer el peso del paquete celular se deberá pesar el tubo falcón antes de juntar los paquetes celulares y después de centrifugarlos, obteniéndolo por la diferencia de pesos.

3. Separación de fases

3.1. Adicionar al paquete celular obtenido 5 mL de agua destilada estéril y resuspender (en el vortex) el paquete celular.

3.2. Adicionar 5 mL de fenol y mezclar perfectamente.

3.3. Incubar a 65°C por 20 min.

3.4. Incubar a 4°C por toda la noche.

4. Fase de diálisis

4.1. Centrifugar a 3800 rpm x 10 min (Centrifuga CENTRA CL).

4.2. Colocar la fase acuosa en una membrana de diálisis, cerrando la base de esta con hilo de algodón. (Antes de agregar el dializado se recomienda agregar agua destilada estéril para confirmar que la membrana se encuentra bien cerrada).

4.3. Cerrar ambos lados de la membrana de diálisis (formando un dulce), y colocarla en un vaso de precipitado que contenga agua destilada estéril.

4.4. Dejar por 3 o 4 días la membrana de diálisis en agua destilada estéril, cambiándola cada 24 horas o hasta eliminar las trazas de Fenol. A lo obtenido se le llama “dializado”.

5. Fase de precipitación

5.1. Colocar el dializado en los tubos Eppendorf

5.2. Centrifugar a 12000 rpm x 10 min (En la centrifuga Eppendorf).

5.3. Pesar tubos Falcon.

5.4. Colocar la fase acuosa en un tubo Falcon previamente pesado.

5.5. Agregar al dializado Acetato de Sodio a concentración final de 0.15M pH 8.0.

5.6. Agregar Etanol Absoluto en una proporción de 1:4.

5.7. Incubar a -20°C x 24horas.

5.8. Centrifugar a 4200 rpm x 20 min.

5.9 Eliminar el sobrenadante y secar a temperatura ambiente x 20 min (para el secado colocar el tubo Falcón boca abajo sobre una sanita, teniendo mucho cuidado con el pellet obtenido para que éste no resbale).

6. Fase de purificación

6.1. Resuspender el pellet en 200 μ L de agua desionizada estéril y pasarlo a un tubo Eppendorf previamente pesado (asegurarse de que el pellet esté completamente disuelto, mezclando por pipeteo).

6.2. Añadir 5 μ L de DNasa I y 5 μ L de RNasa de una solución stock de 10 mg/mL (concentración final 0.25 μ g/ μ L) e incubar por 30 min a 37°C.

6.3. Añadir 10 μ L de proteinasa K de una solución stock de 10 mg/mL (concentración final 0.50 μ g/ μ L) e incubar durante 1 h a 59°C.

7. Obtención de LPS

7.1. Precipitar nuevamente los LPS adicionando etanol 3:1 y llevar a – 20°C toda la noche.

7.2. Centrifugar a 4200 rpm x 20 min y eliminar sobrenadante.

7.3. Pesar el tubo con el pellet seco para que por diferencia se calcule la cantidad de los LPS obtenidos.

7.4. Resuspender el pellet obtenido de LPS en agua destilada estéril.

7.5. Guardar a 4°C hasta su uso.

Referencias:

Nguyen, MP., Tran, L.V.H., Namgoong, H., Kim, Y.H. (2019). Applications of different solvents and conditions for differential extraction of lipopolysaccharide in Gram-negative bacteria. *Journal of Microbiology*. 57.

Renukadevi, K.P., 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.

Protocolo 2. Extracción de lípidos de *Arabidopsis thaliana*

Materiales:

- Plantas de *Arabidopsis thaliana* (3 días de germinación y 7 de crecimiento)
- Tubos de polipropileno de 15 mL
- Gradilla
- Micropipeta 1000 µL
- Puntas azules
- Evaporador de gas N₂
- **Equipos:**
 - Agitador Rocker
 - Incubadora 75°C
- **Reactivos:**
 - Isopropanol
 - Butilhidroxitolueno
 - Cloroformo
 - Metanol
 - KCL 1 M
 - Agua desionizada

Procedimiento:

1. Pesar 500 mg de tejido y transferirlo a 3 mL de isopropanol con 0.01% de butilhidroxitolueno (BHT) a 75°C durante 15 min.
2. Agregar 1.5 mL de cloroformo y 0.6 mL de agua. Agitar por una hora a temperatura ambiente, posteriormente separar el sobrenadante (Extracto A, de este extracto se obtuvo una pequeña cantidad de lípidos, se recomienda reservar hasta el final del experimento).
3. Adicionar cloroformo/metanol (2:1) con butilhidroxitolueno al 0.01 % y agitar durante 30 min a temperatura ambiente. Colocar el sobrenadante en otro tubo previamente pesado (Extracto B, de este extracto se obtiene la mayor cantidad de lípidos). Realizar este paso 5 veces (hasta que el tejido vegetal restante aparezca blanco), colocando el sobrenadante en el mismo tubo.

4. Lavar los extractos combinados (se recomienda utilizar solo el extracto B) con 1 mL de KCL 1M por 10 minutos (aquí se forman dos fases) y retirar la fase superior de la mezcla.
5. Hacer un lavado con 2 mL de agua por 5 min. Eliminar la fase acuosa (fase superior de la mezcla).
6. Evaporar el solvente bajo una corriente de gas N₂.
7. Para conocer la concentración de los lípidos, pesar el tubo con el extracto seco y obtener la concentración por diferencia de peso.
8. Disolver el extracto de lípidos en 200 µL de cloroformo y guardarlos a -20°C hasta su uso.

Referencias:

Kim, H. U. (2020). Lipid Metabolism in Plants. *Plants*. 9:871.

Reszczyńska, E., Hanaka, A. (2020). Lipids Composition in Plant Membranes. *Cell Biochem. Biophys.* 78: 401-414.

Welti, R., Li, W., Li, H., Sang, Y., Biesiada, H., Zhou, H., Rajashekar, C. B., Williams, T. D and Wang X. (2002). Profiling membrane lipids in Plant Stress Responses. *J. biol. Chem.* 277: 31994-32002.

Protocolo 3. Cromatografía de capa fina para lípidos

Materiales:

- Cámara o tanque de vidrio para cromatografía.
- Placas de silica gel para cromatografía 60 F₂₅₄ Merck
- Papel filtro

Reactivos:

- Cloroformo (CHCl₃)
- Metanol (CH₃OH)
- Amonio (NH₄⁺)
- Agua desionizada estéril
- Primulina (0.01% en 80% de acetona)

Procedimiento:

1. Llenar la cámara cromatográfica con los siguientes solventes:
CHCl₃:CH₃OH:NH₄⁺ (60:35:8)
Cloroformo (CHCl₃)
Metanol (CH₃OH)
Amonio acuoso (NH₄⁺)
2. Saturar la cámara con papel filtro durante 1 h.
3. Activar la placa cromatográfica durante 1 h a 100°C.
4. Marcar las placas para colocar la muestra a una distancia de 1.5 cm del borde inferior y 1 cm entre cada muestra y en los bordes laterales.
5. Depositar el extracto (0.125, 0.25, 0.5 y 1 mg concentraciones sugeridas).
6. Introducir la placa a la cámara cromatográfica cuidadosamente para que el sistema de solventes no toque directamente a las muestras y no se diluyan.
7. Correr las muestras hasta que el frente de solventes llegue a 1 cm del borde superior de la placa retirarla (aproximadamente 30-35 min). Secar verticalmente a temperatura ambiente para evaporar los solventes durante 30 min.

Revelado con primulina

1. Rociar la placa con primulina hasta que el adsorbente esté uniforme y dejar secar toda la noche a temperatura ambiente.
2. Observar y tomar fotografías en el transiluminador (312 nm longitud de onda de excitación y 605 nm longitud de onda de emisión) o en fotodocumentador.
3. Analizar la imagen digitalizada con el software image J, midiendo el área y la intensidad de la mancha.
4. Para obtener el factor de retención medir la distancia del origen de la muestra al centro de la mancha, y la distancia del origen de la muestra al frente del solvente.

$RF = \text{Distancia desde el punto de aplicación de la mancha} / \text{distancia desde el punto de aplicación al frente del disolvente}$

NOTAS:

La cantidad de primulina rociada deben ser controlada.

La humedad y el tiempo de aplicación de primulina influyen en la intensidad de fluorescencia.

Referencias:

Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37

Tanaka, T., Kassai, A., Ohmoto, M., Morito, K., Kashiwada, Y., Takaishi, Y., Urikura, M., Morishige, J., Satouchi, K and Tokumura A. (2012). Quantification of phosphatidic Acid in Foodstuffs Using a Thin- Layer -Chromatography-Imaging Technique. *J. Agric. Food. Chem.* 2012. 60. 4156-4161.

Tanaka, T., Horiuchi, G., Matsuoka, M., Hirano, K., Tokumura, A., Koire, T. and Satouchi K. (2009). Formation of Lysophosphatidic Acid, a Wound-Healing Lipid, during Digestion of Cabbage Leaves. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73 .1293–1300.

Protocolo 4. Ensayo histoquímico para la β -glucuronidasa (GUS).

Materiales:

- Micropipeta 1000 μ L
- Puntas azules
- Caja de microtítulo
- Papel aluminio
- Rotulador
- Incubadora 37°C
- Estufa 62°C
- Pinzas relojeras
- Pinceles
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Esmalte transparente
- Microscopio

Reactivos:

- x-Gluc 2mM
- Soluciones de aclaramiento (1 y 2)
- Etanol (40%, 20% y 10% v/v)
- Glicerol 50% v/v

Procedimiento:

1. Adicionar 500 μ L de X-Gluc a los pozos de la caja de microtítulo y con ayuda de las pinzas colocar cuidadosamente las plantas, asegurándose que queden bien sumergidas en la solución.
2. Rotular en la tapa de la caja el nombre del tratamiento.
3. Cubrir la caja con papel aluminio y llevar a incubar a 37°C por un tiempo de 8 horas para la línea *TOR::GUS*. (El tiempo de incubación depende de la línea reportera).

4. Después del tiempo de incubación retirar el x-Gluc en un tubo limpio para poder reutilizarlo (Si el tratamiento tiene bacteria este es desechado).
5. Agregar la solución 1 (500 μ L o 1 mL, debe cubrir las plantas) e incubar a 62°C durante 1 h.
6. Remplazar la solución 1 por la solución 2. Incubar a temperatura ambiente.
7. Retirar la solución 2 y agregar etanol al 40%, 20%, 10% por 20 min en cada concentración.
8. Colocar las plantas en glicerol 50% para su montaje en el portaobjetos.

Referencias:

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

Protocolo 5. Extracción de ARN de *Arabidopsis thaliana* con TRIzol

Materiales:

- Tejido de *Arabidopsis thaliana*
- Nitrógeno líquido
- Tubos Eppendorf
- Morteros
- Espátulas
- Micropipetas 1000 μ L y 100 μ L
- Puntas azules
- Puntas amarillas
- TRIzol
- Cloroformo
- Isopropanol
- Etanol 75%
- Agua libre de RNAsas
- Buffer de reacción de DNasa I
- DNasa I
- Agua DEPC
- EDTA 25 μ M

Procedimiento:

1. Moler 100 mg de tejido con nitrógeno líquido y colectarlo en tubo Eppendorf.
2. Agregar 1 mL de TRIzol y homogenizar las muestras por inversión.
3. Incubar las muestras por 5 min a temperatura ambiente.
4. Adicionar 0.2 mL de cloroformo frío por cada mL de TRIzol utilizado para la lisis. Tapar de forma segura.
5. Agitar vigorosamente con la mano por 15 segundos.
6. Incubar 3 minutos a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a 12 000 g por 15 minutos a 4°C.
8. Transferir la fase acuosa que contiene el RNA a un tubo nuevo.
9. Agregar 0.5 mL de isopropanol frío por cada mL de TRIzol usado para la lisis.
10. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.

- 11.** Centrifugar a 10 000 g por 10 minutos.
- 12.** Remover el sobrenadante.
- 13.** Resuspender el pellet en 1 mL de etanol al 75%.
- 14.** Homogenizar por percusión y centrifugar a 7 500 g por 5 minutos a 4°C.
- 15.** Descartar el sobrenadante.
- 16.** Secar el pellet por 10 minutos en la campana de flujo laminar.
- 17.** Resuspender el pellet en 20-50 µL de agua libre de RNasas.
- 18.** Incubar a 60°C por 10 minutos.
- 19.** Llevar el RNA a un volumen final de 50 µL.
- 20.** Agregar 6 µL del buffer de reacción de DNasa I, 3.5 µL de agua DEPC y 0.5 µL de DNasa I para tener un volumen final de 60 µL.
- 21.** Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente.
- 22.** Inactivar la DNasa I con 1 µL de EDTA 25 µM.
- 23.** Calentar a 65°C por 10 minutos.
- 24.** Almacenar a -70°C hasta su uso.

Referencias:

Este protocolo fue compartido por la D.C. Idolina Flores Cortéz del Laboratorio de Ecología Microbiana.

Protocolo 6. Síntesis de ADNc a partir de ARN de *Arabidopsis thaliana*

1. Preparar la siguiente mezcla de reacción en un tubo Eppendorf.

Reacción	
RNA	X μ L (concentración final 500 ng)
dNTPmix	1 μ L (10 mM)
Oligo dT	1 μ L (100 μ M)
H ₂ O	X μ L
Volumen final	10 μ L

2. Incubar la mezcla a 65°C por 5 minutos y después colocar en hielo por 1 minuto.
3. En otro tubo Eppendorf estéril preparar la siguiente mezcla (ajustar el volumen para las reacciones deseadas, en el ejemplo se prepararon 9 reacciones).

Reacción	9 reacciones
10x RT Buffer 2 μ L	18 μ L
25 mM MgCl ₂ 4 μ L	18 μ L
0.1 M DTT 2 μ L	18 μ L
RNasa OUT 0.5 μ L	a. μ L

4. Agregar 8.5 μ L de la mezcla a cada tubo y centrifugar 3 segundos.
5. Incubar a 42°C por 2 minutos.
6. Agregar 0.5 μ L de SuperScript II RT a cada tubo e incubar a 42°C por 50 minutos.
7. Terminar la reacción a 70°C por 15 minutos.
8. Dar un spin y agregar 0.5 μ L de RNasa H e incubar por 20 minutos a 37°C.

9. Almacenar a -20°C.

Referencias:

Este protocolo fue compartido por la D.C. Idolina Flores Cortez del Laboratorio de Ecología Microbiana.

Protocolo 7. Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cuantitativa (RT-qPCR).

- 1. Preparación de los oligonucleótidos u oligos.** Las secuencias de oligonucleótidos para los genes *RPS6B*, *RPS27B* y *RPL7B* se obtuvieron de Yun-Kyoung et al., 2014. Posteriormente se enviaron sintetizar con la empresa T4 Oligo. A partir de su certificado de análisis obtuvimos la siguiente tabla:

Oligo	Secuencia	T m	Nanomol es finales	µg/O D	PM	µg de oligo
RPS6B-F	CTGTTGTAGCAGCAGTGTCTATCG GA	69. 4	24.66	32	8017. 3	197.7 1
RPS6B-R	CAATGACCAAGTTAAGAACAGACA GGTCA	69. 6	24.13	29.4	8936. 9	215.6 1
RPS27 B-F	TTAGCTTCTTGCGAAGATGGTTCT TCAA	70. 9	24.63	32.6	8584. 7	211.4 4
RPS27 B-R	AGAATTGTCTGGCAGTTTCCGCAC ACCA	77. 4	24.77	32.1	8548. 6	211.7 2
RPL7B-F	CTCCACAGAGGATTTCGGAAATGGT TGAG	74. 2	22.24	31.1	8677. 7	193.0 3
RPL7B-R	ACTCCTTCTCCTTCTCGGCATATT CCTT	71	24.68	35.3	8367. 5	206.5 1

- 2.** Resuspender los oligos en agua libre de nucleasas llevando a una concentración de 100 µM, una vez resuspendidos almacenar a -20°C hasta su uso.
- 3.** Realizar una dilución de los oligos para trabajar con una concentración de 10 µM. Homogenizar bien por pipeteo.

4. **Para las reacciones** adicionar la siguiente mezcla a cada tubo para PCR (vienen por tiras de 8). Se puede preparar la mezcla en tubo Eppendor sin el ADNc y poner 8 μ L de la mezcla general a cada tubo y por separado los 2 μ L del ADNc.

Master mix	5 μ L
Oligo R	1 μ L
Oligo F	1 μ L
ADNc	2 μ L
H ₂ O	1 μ L

5. Una vez terminadas las reacciones colocar cuidadosamente la tira de tapas con ayuda de una pinza estéril.
6. Colocar la placa de los tubos en aluminio y llevar a la centrifuga para microplacas por 1 minuto. Supervisar que no se hayan formado burbujas.
7. Colocar cuidadosamente la placa sobre el termociclador StepOne PCR tiempo real.
8. Abrir el software StepOne y configurar el proceso de PCR. (El volumen final de pocillo fue de 10 μ L, se utilizó el fluorocromo SYBR Green, se corrieron 40 ciclos. La temperatura para el Holding stage fue de 95°C por 10 minutos, la T_m para los oligos en el Cycling stage fue de 70°C para *RPS6B*, *RPS27B* y *RPL7B* y 60°C para los oligos de actina.
9. Analizar los resultados por el método de cuantificación de CT comparativos ($\Delta\Delta$ CT).

Referencias:

Este protocolo fue compartido por la D.C. Idolina Flores Cortez del Laboratorio de Ecología Microbiana.

Protocolo 8. Detección de H₂O₂ en *Arabidopsis thaliana* con DAB

Materiales y equipo:

- 3,3 diaminobenzidina (DAB)
- Etanol 96%
- Agua desionizada
- Micropipetas 1000 µM
- Puntas azules
- Cajas Petri chicas

Procedimiento:

1. Preparar con anticipación la DAB (1mg/mL) en agua desionizada ajustando pH con HCl hasta llegar a 3.5 para que se pueda disolver. (Este paso es tardado 120 minutos aprox).
2. Colocar cuidadosamente las plantas en cajas Petri con un volumen suficiente de DAB para que la planta sea teñida. (Evitar lastimar o estresar a las plantas).
3. Incubar por 30 minutos protegiendo de la luz.
4. Pasar las plantas a un vaso de precipitados que contenga etanol al 96% y calentar hasta que se observe blanco el tejido y se pueda apreciar mejor la producción de H₂O₂. (Aproximadamente 40 min).
5. Colocar las plantas en agua desionizada o en glicerol al 50% para que se puedan documentar.
6. Observar en el microscopio y tomar fotografías ese mismo día.

Referencias:

Thordal-Christensen, H., Zhang, Z, Wei, Y, Collinge, D.B. (1997). Subcellular localization of H₂O₂ in plants: H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. The Plant J. 11(6):1187-1194.

Protocolo 9. Ensayo de la viabilidad celular en *Arabidopsis thaliana*

Materiales y equipo:

- Evans Blue al 0.025% (w/v)
- Agua desionizada
- Micropipetas 1000 μ M
- Puntas azules
- Cajas Petri chicas

Procedimiento:

1. Después de los tratamientos colocar las plantas en cajas Petri que contengan el colorante Evans Blue al 0.025% (w/v) durante 15 minutos.
2. Lavar dos veces con agua desionizada o hasta eliminar por completo el colorante.
3. Observar el tejido en el microscopio y tomar fotografías.
4. Colocar el tejido en un tubo Eppendorf y congelar durante 1 h a -20° C.
5. Adicionar 1 mL de DMSO al tejido congelado y dejar reposar a temperatura ambiente.
6. Tomar lecturas a 600 nm en el espectrofotómetro.
7. Graficar los resultados.

Referencias:

Baker, C. J. y Norton, M. M. (1994). An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using evans blue. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 39: 7-12. <https://doi.org/10.1007/bf00037585>.

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	Doctorado en Ciencias en Biología Experimental	
Título del trabajo	Efecto de los lipopolisacáridos de <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp245 en la función de la fosfolipasa D y la proteína TOR en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	
	Nombre	Correo electrónico
Autor/es	Alma Alejandra Hernández Esquivel	0939557x@umich.mx
Director	Ernesto García Pineda	egpineda@umich.mx
Codirector		
Coordinador del programa	Ernesto García Pineda	egpineda@umich.mx

Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	Sí	se uso la IA gemini como asistente de redacción

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español	No	
Traducción a otra lengua	No	
Revisión y corrección de estilo	No	
Análisis de datos	No	
Búsqueda y organización de información	No	
Formateo de las referencias bibliográficas	No	
Generación de contenido multimedia	No	
Otro		

Datos del solicitante	
Nombre y firma	Alma Alejandra Hernández Esquivel
Lugar y fecha	Morelia Michoacán, 17 de junio del 2025

Alma Alejandra Hernández Esquivel

Efecto de los lipopolisacáridos de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 en la función de la fosfolipasa D

 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid::3117:469185940

Fecha de entrega

23 jun 2025, 8:11 a.m. GMT-6

Fecha de descarga

23 jun 2025, 8:14 a.m. GMT-6

Nombre de archivo

Efecto de los lipopolisacáridos de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 en la función de la fosfolipasapdf

Tamaño de archivo

16.6 MB

230 Páginas

34.967 Palabras

194.941 Caracteres

44% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Fuentes principales

- 37%  Fuentes de Internet
- 35%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alerta de integridad para revisión

-  **Caracteres reemplazados**
221 caracteres sospechosos en N.º de páginas
Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.