



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

LABORATORIO DE TRANSDUCCION DE SEÑALES

**El transporte simplástico de las auxinas participa en el desarrollo de las
raíces laterales de *Arabidopsis thaliana* expuesta a *Azospirillum*
baldaniorum Sp245**

TESIS QUE PRESENTA:

M.C. Elizabeth Carrillo Flores

Para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias en Biología Experimental

Director de tesis

D.C. Elda María Gpe. Beltrán Peña

Co-director de tesis:

D. C. Asdrúbal Aguilera Méndez

Morelia, Mich. Septiembre 2025

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Transducción de Señales del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, bajo la asesoría de la D.C. Elda Beltrán Peña. Para su realización se tuvo el apoyo de la secretaria de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (Secihti), con número de becario 801093

Índice

Resumen	1
Abstract.....	3
1.Introducción.....	5
2. Antecedentes	7
2.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> , como modelo de estudio.....	7
2.2 Zonas de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i>	8
2.3 Desarrollo de las raíces laterales de <i>Arabidopsis thaliana</i>	10
2.4 Etapas del desarrollo de las raíces laterales	11
2.5 Reguladores del crecimiento vegetal	12
2.6 Crecimiento vegetal regulado por las auxinas	13
2.7 Vía de respuesta a las auxinas.....	14
2.7.1 Homeostasis de las auxinas	14
2.7.2 Transporte polar de las auxinas.....	15
2.7.3. Percepción y señalización de las auxinas	16
3. Transporte simplástico a través de los PD.....	17
3.1 Dinámica de la apertura o cierre de los PD.....	18
3.2 Estructura química y biosíntesis de la callosa.....	19
3.3 Participación del transporte simplástico en defensa y en el desarrollo vegetal	21
3.4 Participación del transporte simplástico durante el desarrollo vegetal.....	23
3.4.1 Proteínas localizadas en los plasmodesmos que regulan el desarrollo de <i>A. thaliana</i>	25
4. La rizosfera: nicho de actividad microbiana	31
4.1 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR).....	35
4.1.1 Características de la PGPR <i>Azospirillum</i>	35
5. Justificación	37
6. Hipótesis	37
7. Objetivo general	37
7.1 Objetivos específicos	37

8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
8.1 Material vegetal	39
8.2 Desinfección, siembra e incubación de semillas <i>DR5:GUS</i> , <i>pCRE1::icals3m</i> y <i>pCALS3::icals3m</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
8.3 Movilización del marcador <i>DR5:GUS</i> al fondo genético de <i>pCRE1::icals3m</i> y <i>pCALS3::icals3m</i>	39
8.4 Preparación del medio de cultivo.....	40
8.5 Preparación del medio de cultivo para el mantenimiento de <i>Azospirillum baldaniorum</i>	40
8.6 Detección de AIA bacteriano en plántulas de <i>A. thaliana</i>	41
8.7 Actividad histoquímica de <i>GUS</i>	41
8.8 Movimiento del CFDA	41
8.9 Tinción de la callosa	42
8.10 Evaluación de los parámetros de la arquitectura radicular de las plántulas de <i>A. thaliana</i>	42
8.11 Análisis estadístico	42
9. Resultados	44
9.1 <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp245 modifica la arquitectura del sistema radicular e induce cambios en la expresión de <i>DR5:GUS</i>	44
9.2 La inducción de raíces laterales en <i>A. thaliana</i> implica tanto la señalización de auxinas como el transporte simplástico	46
9.3 <i>A. baldaniorum</i> Sp245 modula diferencialmente la expresión de <i>DR5:GUS</i> en <i>pdlp5-1 DR5:GUS</i> y <i>PDLP5OE DR5:GUS</i>	49
9.4 El transporte simplástico y la acumulación de callosa son modulados por <i>A. baldaniorum</i> Sp245 en el sistema radicular de <i>A. thaliana</i>	52
9.5 Participación de CALS3 durante el desarrollo de las RL de <i>A. thaliana</i> inducidas por <i>A. baldaniorum</i> Sp245	54

9.6 Efecto de <i>A. baldaniorum</i> sobre la arquitectura radicular de <i>pCALS3::icals3m</i>	57
10. Discusión	60
11. Conclusión	66
12. Bibliografía	67
13. Anexos	83
13.1 Plasmodesmata role on plant development regulation.....	83
13.2 Participación del transporte simplástico de las auxinas durante el desarrollo de las plantas	84
13.3 The plant growth-promoting rhizobacteria <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp245 induced root branching through the participation of PLASMODESMATA-LOCATED PROTEIN 5 in <i>Arabidopsis thaliana</i>	85

Índice de figuras

Figura 1. Planta de <i>Arabidopsis thaliana</i>	8
Figura 2. Estructura de la raíz primaria de <i>A. thaliana</i>	9
Figura 3. Red que controla la organogénesis de las raíces laterales.....	11
Figura 4. Adquisición de la identidad celular durante la morfogénesis del primordio de la raíz lateral.	12
Figura 5. Principales hormonas vegetales	13
Figura 6. Homeostasis de las auxinas	13
Figura 7. Transporte de las auxinas	16
Figura 8. Modelo de la percepción y señalización de las auxinas	16
Figura 9. Estructura de los PD.....	19
Figura 10. Modelo del mecanismo de la síntesis de callosa.	20
Figura 11. Componentes de los PD involucrados en la respuesta de defensa del hospedero.	22
Figura 12. La mutación de <i>GSL8</i> impide la respuesta fototrópica del hipocótilo y altera la deposición de callosa	23
Figura 13. <i>CALS3</i> regula el desarrollo de la raíz de <i>A. thaliana</i>	24
Figura 14. Respuesta de hiponastia en plantas de Wt, <i>gsl8</i> y <i>pin3pin4pin7</i> de <i>A. thaliana</i>	24
Figura 15. La sobreexpresión de <i>PDCB1</i> incrementa los sitios de iniciación de las RL.	24
Figura 16. <i>PDL5</i> regula el desarrollo vegetal.	28
Figura 17. <i>PDL5</i> regula el desarrollo de las RL de <i>A. thaliana</i>	29
Figura 18. La sobreexpresión de <i>PDL5</i> y <i>PDL6</i> causan un retraso en el crecimiento y la sobre acumulación de almidón en <i>A. thaliana</i>	30
Figura 19. Distribución de las auxinas regulada por el transporte polar de auxinas y el transporte simplástico en la raíz primaria de <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
Figura 20. Distribución de los microorganismos en la rizosfera.....	33
Figura 21. Circuito de retroalimentación entre la rizosfera y los exudados radiculares.	34
Figura 22. Efectos de <i>A. baldaniorum</i> Sp245 sobre el crecimiento de plántulas de <i>A. thaliana</i>	45
Figura 23. Efecto de <i>A. baldaniorum</i> sobre el nivel de auxinas.....	46
Figura 24. <i>A. baldaniorum</i> Sp245 para inducir raíces laterales de <i>Arabidopsis thaliana</i> requiere parcialmente a <i>PDL5</i>	47
Figura 25. <i>A. baldaniorum</i> Sp245 regula el desarrollo de las raíces laterales de <i>A. thaliana</i> a través de <i>PDL5</i>	47

Figura 26. <i>A. baldaniorum</i> modula la expresión del marcador auxina mediante PDLP5.	51
Figura 27. Efecto del NPA en la promoción de desarrollo de las raíces laterales de <i>A. thaliana</i> por <i>A. baldaniorum</i> Sp245	50
Figura 28. <i>PDLP5OE DR5:GUS</i> reduce la permeabilidad de los plasmodesmos en <i>A. thaliana</i>	53
Figura 29. <i>A. baldaniorum</i> induce la deposición de callosa en la raíz de <i>A. thaliana</i>	54
Figura 30. Efecto de <i>A. baldaniorum</i> Sp245 sobre la arquitectura radicular de <i>pCRE1::ical3m</i>	55
Figura 31. Efecto de <i>A. baldaniorum</i> sobre la arquitectura radicular y el nivel de auxinas de <i>pCRE1::ical3m DR5:GUS</i>	57
Figura 32. Efecto de <i>A. baldaniorum</i> Sp245 sobre la arquitectura radicular de <i>pCALS3::ical3m</i>	58
Figura 33. Efecto de <i>A. baldaniorum</i> Sp245 sobre la arquitectura radicular y el nivel de auxinas de <i>pCALS3::ical3m DR5:GUS</i>	59

Resumen

La rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) *Azospirillum baldaniorum* Sp245 tiene la capacidad de estimular el desarrollo de las raíces laterales (RL) mediante la producción de la auxina; ácido indol-3-acético (AIA). Esta fitohormona que participa prácticamente en cualquier proceso de desarrollo vegetal, es sintetizada en la parte aérea de la planta y transportada hacia los tejidos demandantes como la raíz a través del transporte polar de auxinas (PAT, por sus siglas en inglés). El AIA además de moverse por el PAT también lo hace mediante los plasmodesmos (PD). Los PD son canales que comunican el citoplasma de células vecinas y permiten el movimiento de ciertas moléculas, fenómeno denominado como transporte simplástico (TS). El TS está regulado respectivamente, por el cierre o apertura de los PD a través de la deposición o degradación de callosa sobre el cuello de los PD. La callosa es un polímero de glucosas sintetizado por las sintasas de callosa (CALS) y su deposición sobre el cuello de los PD es facilitada por las proteínas PDL5 y PDCB. La degradación de la callosa por las β -glucanasas ocasiona la apertura de los PD. Las plantas durante el ataque de patógenos incrementan la síntesis y la deposición de callosa para cerrar los PD e impedir la propagación del microorganismo hacia otros tejidos. El TS también está implicado en la regulación de diferentes procesos de desarrollo vegetal, entre ellos el de las RL. En este estudio se investigó la participación del TS en la estimulación del desarrollo de las RL de *A. thaliana* inoculada con *A. baldaniorum*, mediante el análisis del efecto de la bacteria en las líneas *pdlp5-1 DR5:GUS* y *PDL5OE DR5:GUS* de *A. thaliana* que respectivamente presentan un aumento y restricción del TS. Además, se utilizaron las dobles mutantes de ganancia de función de la sintasa de callosa condicionadas a estradiol: *pCRE1::icals3m* y *pCALS3::icals3m* de *A. thaliana*. Se observó en *pdlp5-1 DR5:GUS* que *A. baldaniorum* Sp245 incremento el desarrollo de los primordios de las raíces laterales y en 40% de las RL e indujo un aumento del marcador de auxinas en el haz vascular de la RP, respecto al efecto ocasionado en *PDL5OE DR5:GUS*. Al determinar la influencia del PAT sobre el TS empleando las líneas mutantes y de sobreexpresión de *PDL5*, en *pdlp5-1 DR5:GUS* la inhibición del PAT y el aumento del TS ocasionaron una disminución del desarrollo de las RL durante su interacción con *Azospirillum*. Respecto al cierre del TS en el floema que se presenta en *pCALS3::icals3m* en

presencia de estradiol, la rizobacteria fue incapaz de estimular el desarrollo y el crecimiento de las RL, además de disminuir el nivel de auxinas en el haz vascular de la RP. Mientras que, la restricción del TS en el sistema vascular de la raíz en *pCRE1::icals3m* con *A. baldaniorum* estimulo el desarrollo de las RL.

Palabras clave: auxinas, *Azospirillum baldaniorum*, plasmodesmos, raíces laterales, transporte simplástico

Abstract

The plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) *Azospirillum baldaniorum* Sp245 is capable of stimulating lateral root (LR) development by through auxin, indole-3-acetic acid (IAA). This phytohormone, which is involved in virtually every plant development process, is synthesized in the plant aerial parts and transported to the demanding tissues, such as the root through polar auxin transport (PAT). In addition to being mobilized through the PAT, IAA also travels through plasmodesmata (PD). PDs are channels that connect the neighboring cells cytoplasm, allowing the certain molecules movement, a phenomenon known as symplastic transport (ST). ST is regulated, respectively by the PD closure or opening through the deposition or degradation PD on neck callose. Callose is a glucose polymer synthesized by callose synthases (CALS), and its deposition on the PD neck is facilitated by the proteins PDL5 and PDL6. Callose degradation by β -glucanases leads to the opening of PD. During pathogen attack, plants increase callose synthesis and deposition on neck P closed it and prevent the spread of the microorganism to other tissues. TS is also involved in the different plant development processes regulation, including that of lateral root (LR). In this study, the TS participation on stimulating of LR development in *A. thaliana* inoculated with *A. baldaniorum* was investigated by analyzing the effect of the bacteria on lines *pdl5-1 DR5:GUS* and *PDL5OE DR5:GUS A. thaliana*, which respectively present an ST increase and restriction. In addition, double gain-of-function mutants of callose synthase conditioned to estradiol *pCRE1::icals3m* and *pCALS3::icals3m* of *A. thaliana* were used. In *pdl5-1 DR5:GUS*, *A. baldaniorum* Sp245 was observed to increase the lateral root primordia development and LR in 40% and to induced an increase in the auxin marker in the RP vascular bundle, compared to the effect caused in *PDL5OE DR5:GUS*. When determining the influence of PAT on the TS using the mutant and PDL5 overexpression lines, in *pdl5-1 DR5:GUS* the PAT inhibition and the increase in TS caused a decrease in the LR development during its interaction with *Azospirillum*. Regarding the ST closure the in the phloem present in *pCALS3::icals3m* in the presence of estradiol, the rhizobacteria were unable to stimulate the LR development and growth, in addition to decreasing the auxins

level in the RP vascular bundle. Meanwhile, the ST restriction in the root vascular system in *pCRE1::icals3m* with *A. baldaniorum* stimulated the LR development.

Key words: auxins, *Azospirillum baldaniorum*, lateral roots, plasmodesmata, symplastic transport

1. Introducción

El sistema radicular (SR) está conformado por la raíz primaria (RP), las raíces laterales (RL) y los pelos radicales (PR), el cual además de mantener a la planta anclada al suelo sirve para la adquisición de agua y nutrientes requeridos para su desarrollo (Ren *et al.*, 2019). La PGPR, *A. baldaniorum* Sp245 (antes *A. brasilense* Sp245) (dos Santos *et al.*, 2020) detiene el crecimiento de la RP y promueve el desarrollo de las RL y de los PR, fenotipo atribuido al AIA sintetizado por la bacteria. Para analizar si el AIA bacteriano está involucrado en la alteración del SR de *A. thaliana*, Spaepen y col., 2014 inocularon plántulas con dos cepas de *A. brasilense*: silvestre o la mutante FAJ0009 (sintetiza bajas cantidades de auxinas). Aquí observaron que la inoculación con la cepa silvestre arrestó el crecimiento de la RP e incremento el número de raíces laterales (NRL) y de los PR. En tanto que las plántulas inoculadas con FAJ0009 presentaron un fenotipo similar al control sin inocular. Estos resultados les permitieron sugerir que las auxinas sintetizadas por la bacteria inducen los cambios del sistema radicular de *A. thaliana*.

El AIA, se sintetiza en el follaje y moviliza hacia la raíz a través del floema y del PAT. El PAT se lleva a cabo célula-célula y requiere de los acarreadores de influjo AUXIN1/LIKE-AUX1 (AUX1/LAX, por sus siglas en inglés) y de eflujo PIN-FORMED (PIN, por sus siglas en inglés) y ATP-binding cassette transporters of the B subfamily/multidrug resistance/P-glycoprotein (ABCB/MDR/PGP, por sus siglas en inglés) (Han *et al.*, 2021). Carrillo-Flores y col., 2022 reportaron que la inoculación con *A. brasilense* Sp245 en plántulas *DR5:GUS* incrementó en los primeros días de interacción el nivel de auxinas en el haz vascular, mientras que al quinto y sexto día las auxinas se relocalizaron en los meristemos de las RL. La participación del PAT en dicha relocalización se determinó con el uso del inhibidor químico del PAT, el ácido N-1-naftiltalámico (NPA) y con la mutante *tt4* en la síntesis de flavonoides (inhibidores endógenos del PAT) la cual presenta un PAT acelerado (Burbulis *et al.*, 1996). Los autores observaron fenotipos contrastantes ya que la inhibición del PAT redujo el NRL de *Arabidopsis* expuesta a la rizobacteria, mientras que en las plántulas *tt4* la bacteria lo incremento. Esto les permitió sugerir que el PAT está involucrado en la estimulación del desarrollo de las RL de *Arabidopsis* durante la interacción con la bacteria. Por otra parte, Mora y col. (2023), analizaron el efecto de la rizobacteria *A. argentinense* AZ39 sobre el nivel de auxinas durante su interacción con plántulas *DR5:GUS* de *A. thaliana*. La

inoculación con la rizobacteria incremento la expresión de *GUS* cuantificado por fluorescencia en las plántulas de *DR5:GUS* comparado con las plántulas control sin inocular.

Como los experimentos antes mencionados proponen que los cambios del fenotipo radicular de *A. thaliana* por *A. baldaniorum* se deben a las auxinas, en nuestro grupo se analizó que elementos de la vía de respuesta a auxinas (homeostasis, transporte, percepción y señalización) (Casanova-Sáez *et al.*, 2021) podrían estar participando durante dicha interacción. Para ello analizamos el efecto de *Azospirillum* sobre las mutantes de *Arabidopsis* en la síntesis (*yucca3 yucca6*), en el transporte (*aux1-7*, *pin1*, *pin2* y *pin3*) y en la percepción y señalización de (*axr1-3*, *tir1afb2afb3*, *slr1/IAA14* y *arf1arf19*) de las auxinas. Determinamos que ninguno de dichos elementos participaba, lo cual fue sorprendente porque previamente habíamos mostrado que el PAT estaba involucrado en el desarrollo de las RL estimulado por la bacteria. Así que analizamos otros transportadores de eflujo, como los PGP (Baily *et al.*, 2008), en las mutantes *pgp1*, *pgp4* y *pgp19* de *Arabidopsis*, que fueron inoculadas con *A. brasilense*, donde solo en la mutante *pgp1*, *Azospirillum* ocasiono una disminución del NRL (Carrillo-Flores *et al.*, 2022).

Por otra parte, se ha reportado que AXR4-1 ayuda al posicionamiento correcto de los transportadores de influjo (AUX/LAX) (Dharmasiri *et al.*, 2006) y BEN2 de los transportadores de eflujo (PIN) (Tanaka *et al.*, 2013). Así que analizamos el efecto sobre las mutantes *axr4-1* y *ben2* expuestas a la bacteria donde no se observó el incremento característico del NRL, lo que sugiere que estas proteínas, así como *pgp1* estimulan el desarrollo de las RL por *A. brasilense* (Carrillo-Flores *et al.*, 2022). Por otra parte, Mellor y col. (2020), compararon el nivel de auxinas predichos por un modelo *in silico* en la raíz de *A. thaliana* respecto a los datos experimentales de la línea reportera *DR5:VENUS*. Estos autores observaron que el nivel de auxinas entre los datos predichos por el modelo *in silico* que solo consideraba al PAT no concordaba con el nivel observado en la línea reportera. Sin embargo, cuando incorporaron al modelo, tanto al PAT como al TS observaron una alta similitud del nivel de auxinas en ambas aproximaciones. Esto les permitió a los autores sugerir que deben ser considerados ambos tipos de transporte en cualquier proceso de desarrollo vegetal donde participe el movimiento de las auxinas. Por lo antes mencionado, el presente estudio tiene como objetivo determinar la participación del TS de las auxinas durante el desarrollo de las RL de *A. thaliana* estimulado por *A. baldaniorum*.

2. Antecedentes

2.1 *Arabidopsis thaliana*, como modelo de estudio

A. thaliana es una dicotiledónea que pertenece a la familia de las *Brassicaceae* y se distribuye en Europa, Asia y Norteamérica. *Arabidopsis* es una planta modelo porque presenta las siguientes características: i) un ciclo de vida corto, que se completa entre 6 y 8 semanas desde la germinación de las semillas hasta la senescencia de la planta (Wilson, 2000); ii) genoma completamente secuenciado y constituido por 125 millones de bases que codifican aproximadamente para 25000 genes. Esto ha facilitado la obtención de mutantes, líneas de sobreexpresión y reporteras que sirven para el estudio de los procesos moleculares involucrados durante el desarrollo de *A. thaliana* y iii) tamaño pequeño, *A. thaliana* está formada por una roseta de 2-4 cm de diámetro aproximadamente de donde emerge un tallo que alcanza una altura de 20-70 cm, las hojas caulinas se presentan a lo largo del tallo, además las flores que se desarrollan en los tallos florales dan lugar a vainas alargadas denominadas silicuas. Las inflorescencias se presentan en racimos en el extremo del tallo, donde se van separando a medida que el tallo crece (Fig. 1) (Jasinski *et al.*, 2019).

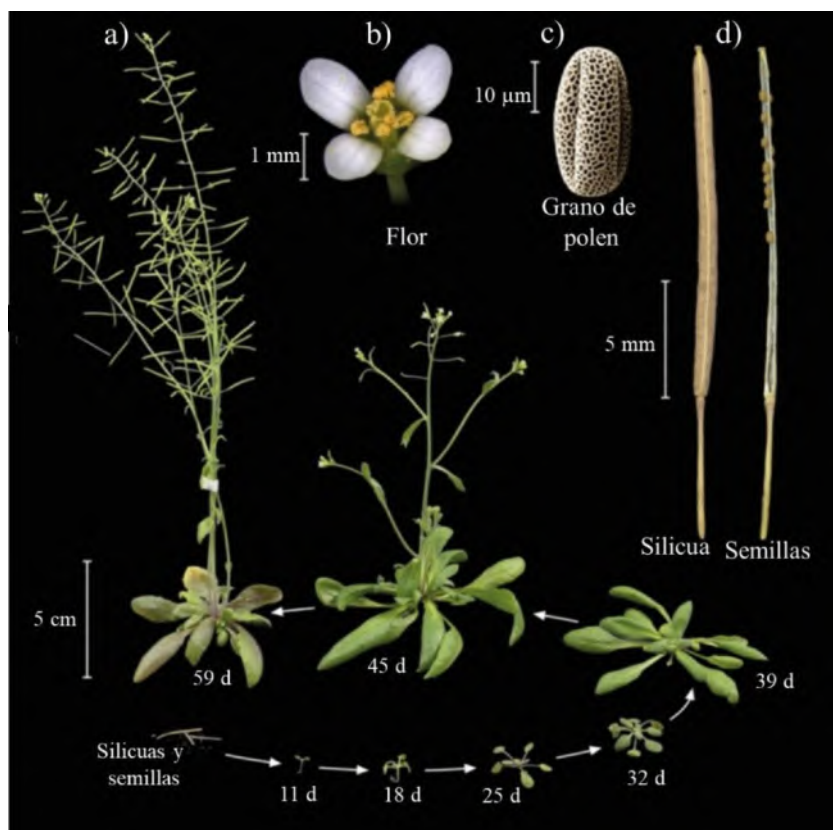


Figura 1. Desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. La planta adulta de *A. thaliana* presenta una pequeña roseta, en la etapa vegetativa a partir de la roseta se desarrolla el tallo principal y los tallos florales donde se producen las silicuas. **a)** Imagen del desarrollo de *Arabidopsis* desde la germinación de la semilla hasta una planta adulta. **b)** Estructura de una flor. **c)** Micrografía de un grano de polen. **d)** Silicuas maduras con semillas (Jasinski *et al.*, 2019).

2.2 Zonas de la raíz de *Arabidopsis thaliana*

El sistema radicular es esencial para las plantas debido a que es el órgano que permite la absorción de agua y nutrientes y su anclaje al suelo (Jan *et al.*, 2024). El SR de *A. thaliana*, está conformado por la RP, las RL y los PR. A su vez, la raíz primaria se divide en cuatro zonas: meristemática (ZM), de transición (ZT), de elongación (ZE) y la zona de diferenciación (ZD) donde se forman los pelos radicales. El crecimiento de la RP depende tanto de la división como de la elongación celular (Fig. 2). La ZM que es la más cercana a la columela, se caracteriza por tener una alta actividad mitótica, a partir de las cuales se generan los distintos tipos de células que conforman a la raíz. Posteriormente, se encuentra la ZT donde las células comienzan a crecer lentamente, tanto en amplitud como en longitud para

posteriormente alargarse en la ZE. En la ZD las células dejan de crecer y alcanzan un estado maduro donde algunas células de la epidermis desarrollan pelos radicales (Barrada *et al.*, 2015; Zluhan-Martínez *et al.*, 2021).

La RP como las RL están formadas por distintos tipos de capas celulares: la epidermis, córtex y endodermis que presentan un arreglo de cilindros concéntricos que rodean a la capa del periciclo y este a su vez al haz vascular (Fig. 2b). La cofia y la columela se localizan en la punta de la raíz para protegerla de la fricción durante la exploración del suelo (Barrada *et al.*, 2015; Zluhan-Martínez *et al.*, 2021).

El mantenimiento de la raíz surge a partir de las células iniciales, las cuales se mantienen un estado indiferenciado por eventos de señalización provenientes de un grupo pequeño de células con escasa actividad mitótica, denominado centro quiescente (QC, por sus siglas en inglés). Al QC rodeado por las células iniciales se le conoce con nicho de células fuente (SCN, por sus siglas en inglés) (Fig. 2b) (Barrada *et al.*, 2015; Svolacchia *et al.*, 2020).

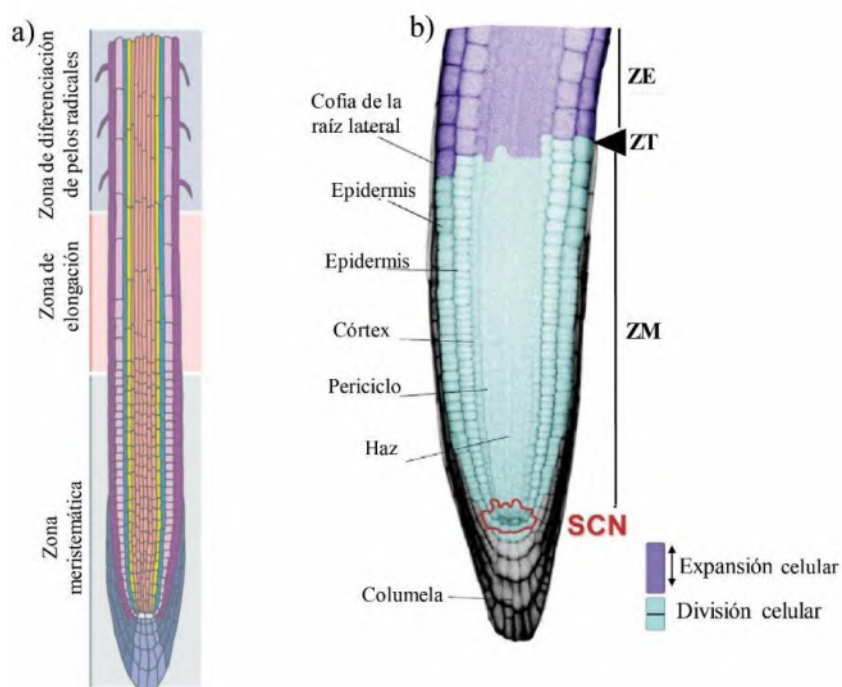


Figura 2. Estructura de la raíz primaria de *A. thaliana*. **a)** La raíz primaria se divide en diferentes zonas: meristemática, de elongación y de diferenciación de pelos radicales. **b)** Diferentes zonas de la RP y el arreglo cilíndrico concéntrico de diversas capas. Las diferentes zonas radicales coloreadas resaltan el proceso celular (Svolacchia *et al.*, 2020).

2.3 Desarrollo de las raíces laterales de *Arabidopsis thaliana*

Las raíces laterales son órganos posembriónicos que se forman por la estimulación de las auxinas en la zona de diferenciación de la RP a partir de algunas células del periciclo posicionadas en forma adyacente a los polos del xilema. Posteriormente, estas células se desdiferencian y proliferan formando un primordio de la raíz lateral (PRL). El desarrollo de las RL comprende las siguientes etapas: primación, iniciación y elongación. En la primera etapa las células del periciclo conocidas como células fundadoras son marcadas por las auxinas lo que promueve la degradación del represor IAA28 y la liberación de los factores ARF 5, 6, 7, 8 y 19 (Eljebbawi *et al.*, 2021) (Fig. 3). Posteriormente, en el sitio de preramificación, ocurre el establecimiento de la identidad de estas células cuando el represor SOLITARY ROOT (SLR)/ Indol-3-Acetic Acid 14 (IAA) es degradado y libera a los ARF7 y 19, los cuales estimulan la migración nuclear de las células fundadoras de los PRL. En la etapa de iniciación de los PRL, altos niveles de auxinas causan la degradación del represor BODENLOS (BDL)/IAA12 para liberar al ARF5, el cual junto con los ARF7 y 19 liberados durante la pre-ramificación inducen el patrón y la iniciación de las RL. La célula del periciclo se divide anticlinalmente para generar dos células, las cuales posteriormente se dividen periclinalmente, generando así varias capas que dan lugar al PRL. Finalmente, en la etapa de elongación se degrada SHORT HIPOCOTYL 2 (SHY2)/IAA3 con la consecuente liberación del ARF7, que junto con los ARF7 y 19 promueven que el primordio rompa paulatinamente las diferentes capas de la RP hasta alcanzar la epidermis (Fig. 3) (Banda *et al.*, 2019).

Por otro lado, durante la organogénesis de las RL también se ha involucrado a las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). El estado redox varía entre las diferentes zonas de la RP: ZT, ZM y ZE. En la ZT, el factor de transcripción UPBEAT1 (UPB1) regula la homeostasis del superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las células en la ZM se pueden mantener ahí o dirigirse hacia la ZT por una alta relación (O_2^-/H_2O_2) que estimula la división celular, la cual requiere altas concentraciones de O_2^- (Fedoreyeva y Kononenko, 2025).

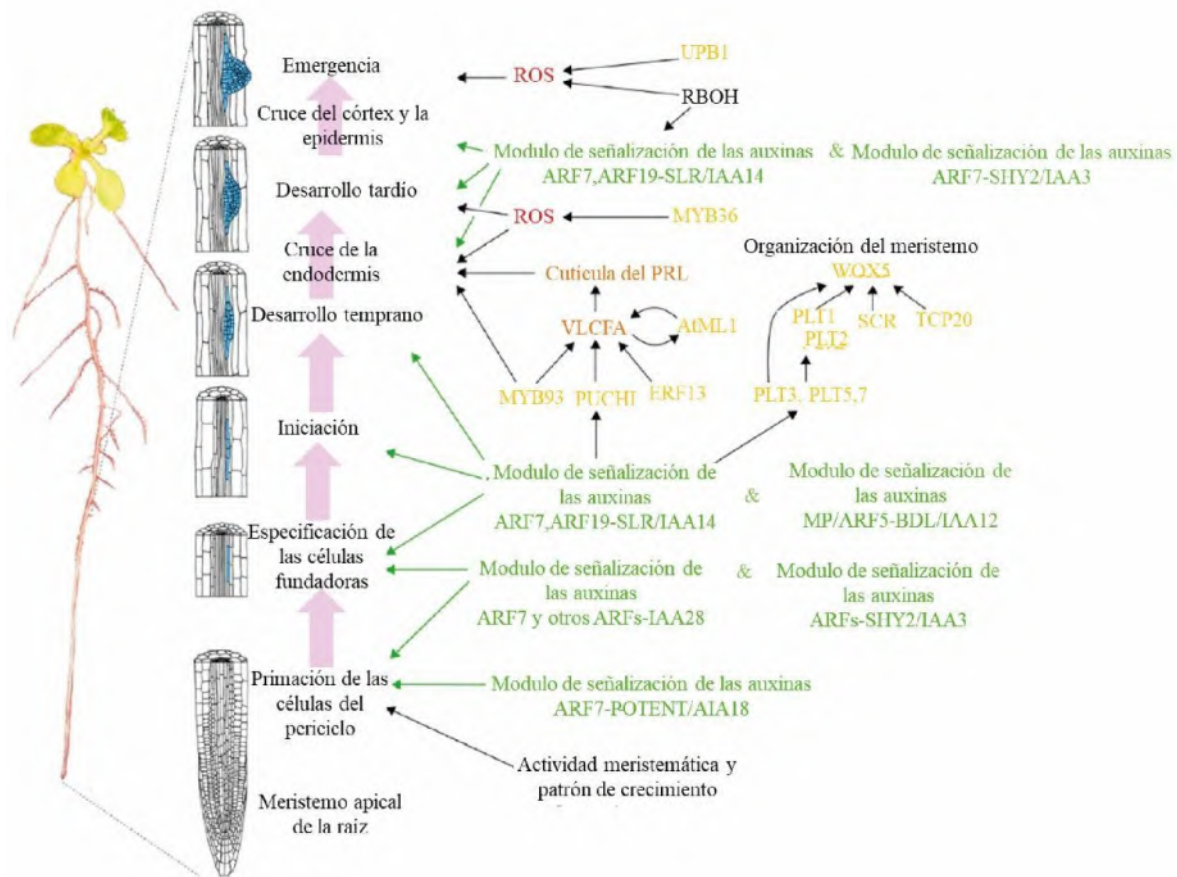


Figura 3. Red que controla la organogénesis de las raíces laterales. Los módulos de señalización de las auxinas (color verde) y de las ROS regulan la formación de las RL de *A. thaliana*. Las flechas verdes representan las etapas sucesivas de la formación de las RL (Beckers *et al.*, 2025).

2.4 Etapas del desarrollo de las raíces laterales

La formación de RL ocurre a través de dos procesos: i) la estimulación de la diferenciación y proliferación de algunas células del periciclo que formaran el PRL, el cual crecerá a través de las capas celulares superpuestas de la RP y eventualmente surgirá al romper la epidermis y ii) la formación del meristemo de la RL. Malamy y Benfey (1997), clasifican el desarrollo de los PRL en las siguientes etapas: I) iniciación del primordio en un plano longitudinal, con aproximadamente ocho divisiones a partir de una célula del periciclo. II) el primordio consta de dos capas celulares generadas por una división periclinal de la primera capa. III) se lleva a cabo otra división periclinal para dar lugar a la formación de una tercera capa de células. IV) el primordio consta de cuatro capas. V) el primordio alcanza el córtex. VI) el primordio forma un domo que alcanza la epidermis, a partir de la VII) el PRL al romper la epidermis forma una RL (Fig. 4).

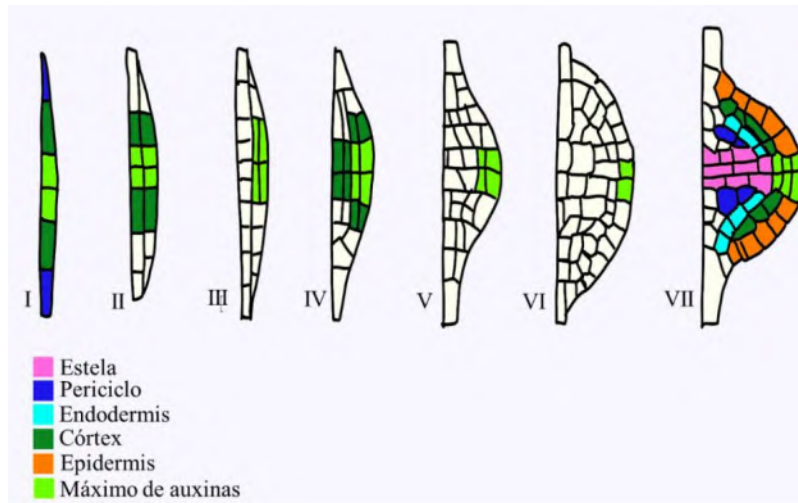


Figura 4. Adquisición de la identidad celular del primordio de la raíz lateral. Los números corresponden a las etapas de desarrollo del PRL. Los diferentes colores señalan la identidad celular emergente (Malamy y Benfey, 1997).

2.5 Reguladores del crecimiento vegetal

Los reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas son producidos en tejidos específicos y se transportan a células distantes para desencadenar una respuesta. Estas fitohormonas integran en redes, las señales ambientales y de desarrollo que no solo regulan la morfología de las plantas, sino que también las preparan para responder a diferentes tipos de estreses bióticos y abióticos. Las fitohormonas según su función se clasifican en dos grupos: i) regulan la defensa y ii) modulan el desarrollo vegetal. En el primer grupo se encuentran el ácido salicílico, el ácido jasmónico y el etileno. Mientras que el segundo grupo, comprende a las auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico, estrigolactonas y los brasinoesteroides (Fig. 5) (Santner *et al.*, 2009).

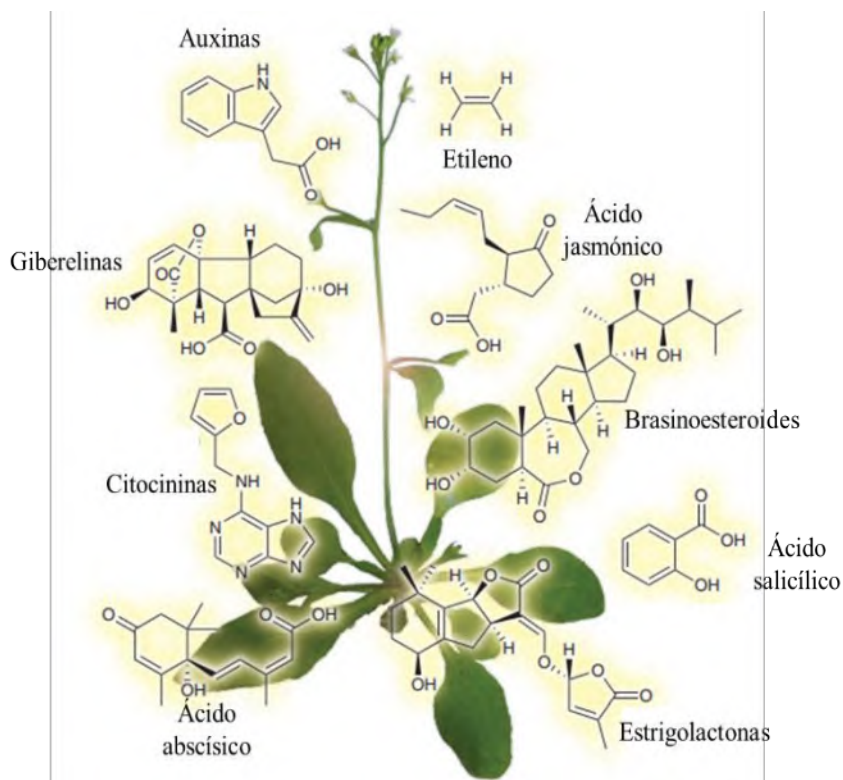


Figura 5. Principales fitohormonas vegetales. Debido a la naturaleza sésil de las plantas, las fitohormonas desempeñan funciones específicas en redes de señalización de una gran variedad de procesos requeridos para regular su ciclo de vida (Santner *et al.*, 2009).

2.6 Crecimiento vegetal regulado por las auxinas

Las plantas coordinan su crecimiento y desarrollo a nivel de tejidos y órganos mediante fitohormonas. Las auxinas cuyo nombre que se deriva de la palabra griega *auxen* que significa crecer es la fitohormona que participa en prácticamente en todos los procesos de desarrollo vegetal que van desde la reproducción, embriogénesis, elongación del hipocótilo, formación de las RL y de los PR (Brumos *et al.*, 2018). Las auxinas, además regulan las respuestas trópicas a la luz y gravedad (Swarup y Bhosale, 2019). La vía de respuesta a las auxinas involucra diferentes procesos: i) homeostasis que comprende la biosíntesis, conjugación (unión del AIA a Ala, Leu y Glu) o degradación (Casanova-Sáez *et al.*, 2021); ii) el transporte direccional a través del PAT mediante los transportadores de influjo: AUXIN1/LIKE-AUX1 y de eflujo PIN y ABCB/MDR/GPG, los cuales generan un gradiente de auxinas en los tejidos y iii) percepción y señalización a través de una regulación transcripcional (Schaller *et al.*, 2015).

2.7 Vía de respuesta a las auxinas

2.7.1 Homeostasis de las auxinas

La homeostasis de las auxinas implica el equilibrio dinámico entre la biosíntesis, degradación o conjugación del AIA que las inactiva para mantener un nivel de la hormona adecuado para el desarrollo vegetal. La biosíntesis del AIA se lleva a cabo por dos rutas: dependiente e independiente del triptófano (Trp). En la primera a partir del precursor Trp, existen cuatro vías distintas que se denominan de acuerdo a la molécula intermediaria: indolacetamida (IAM), ácido indol-3-pirúvico (IPA), triptamina (TAM) e indol-3-acetaldoxima (IAOx) (Fig. 6a). En la vía independiente del Trp, el antranilato es el precursor para la formación del AIA. En *A. thaliana* la principal vía de síntesis del AIA se da a través de la IPA, donde el Trp es convertido por la Trp Aminotransferasa (TAA) a IPA, el cual posteriormente es oxidado y transformado al AIA por las proteínas YUCCA (YUC), una clase de flavin mono-oxigenasas (Fig. 6a) (Cao *et al.*, 2019).

El nivel de AIA libre se regula mediante su conjugación con azúcares o aminoácidos, mediada por la familia de las proteínas amido-synthetases Gretchen Hagen 3 (GH3) (Ruiz Rosquete *et al.*, 2012) (Fig. 6b). En *Arabidopsis* seis proteínas GH3 participan en la conjugación del AIA con los aminoácidos (Westfall *et al.*, 2016). Mientras que la degradación del AIA por oxidación es catalizada por las IAA oxidasas que dan lugar al ácido 2-oxoindol-3-acético (OxIAA) (Rolón-Cárdenas *et al.*, 2022) (Fig. 6b). El AIA también puede ser metilado por IAMT1, una carboxil metiltransferasa (Takubo *et al.*, 2020).

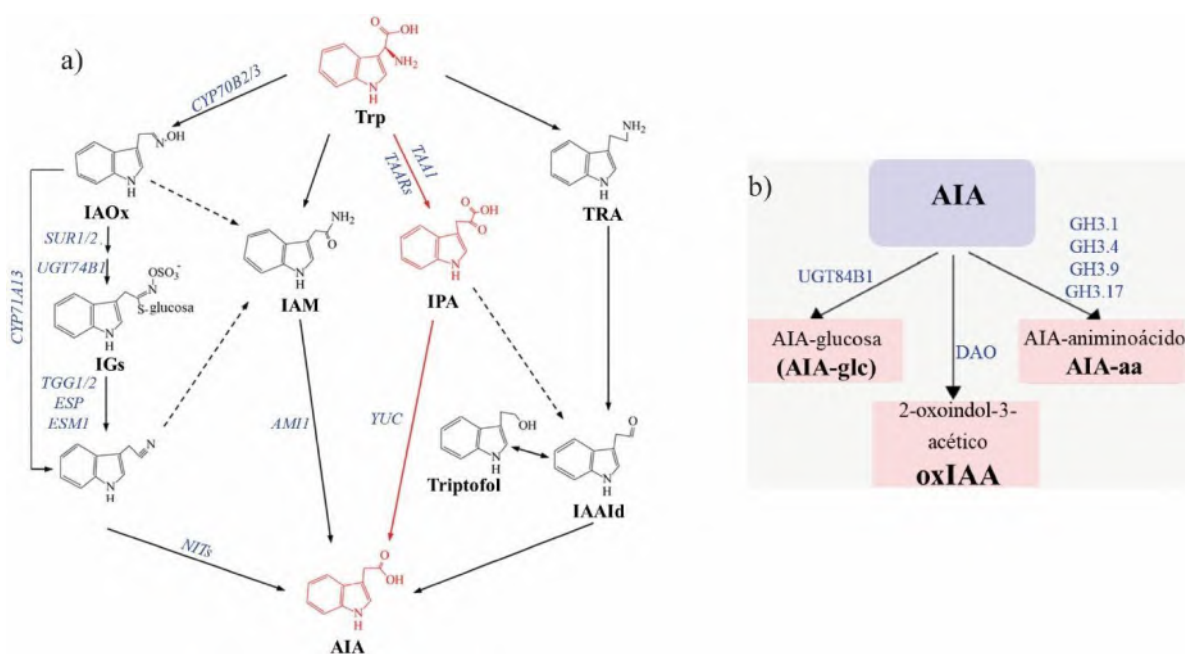


Figura 6. Homeostasis de las auxinas. a) Las cuatro vías de síntesis de AIA dependientes del Trp. Las flechas solidas indican las vías en las que se conocen los genes que codifican para las enzimas y las discontinuas son vías que no están bien definidas (Mod. Cao *et al.*, 2019). **b)** Elementos involucrados en el almacén y degradación del AIA (Mod. Rolón-Cárdenas *et al.*, 2022).

2.7.2 Transporte polar de las auxinas

Las auxinas desde los sitios de síntesis en la parte aérea son distribuidas a los distintos órganos demandantes como la raíz por dos tipos de transporte; uno rápido y no direccional que utiliza el floema (Fig. 7a). Mientras que, el PAT, se efectúa célula-célula con la ayuda de los acarreadores de influjo AUX/LAX y de eflujo PIN/ABCB/PGP (Fig. 7b) (Cui *et al.*, 2023). Debido a que el AIA es un ácido débil con un pKa de 4.75, a pH ácido las plantas lo adquieren protonado (AIAH) y en forma aniónica (AIA⁻) a pH neutro. El pH en la pared celular es de 5.5, por lo cual alrededor del 15% del AIA está en forma protonada y puede difundir a través de la membrana. Mientras que, el citosol cuyo pH es de 7 favorece la estructura aniónica AIA⁻ por lo que no puede ser transportado a través de la membrana a las células vecinas, así que su transporte requiere tanto de acarreadores de influjo como de eflujo (Robert y Friml, 2002; Luschnig y Friml, 2024).

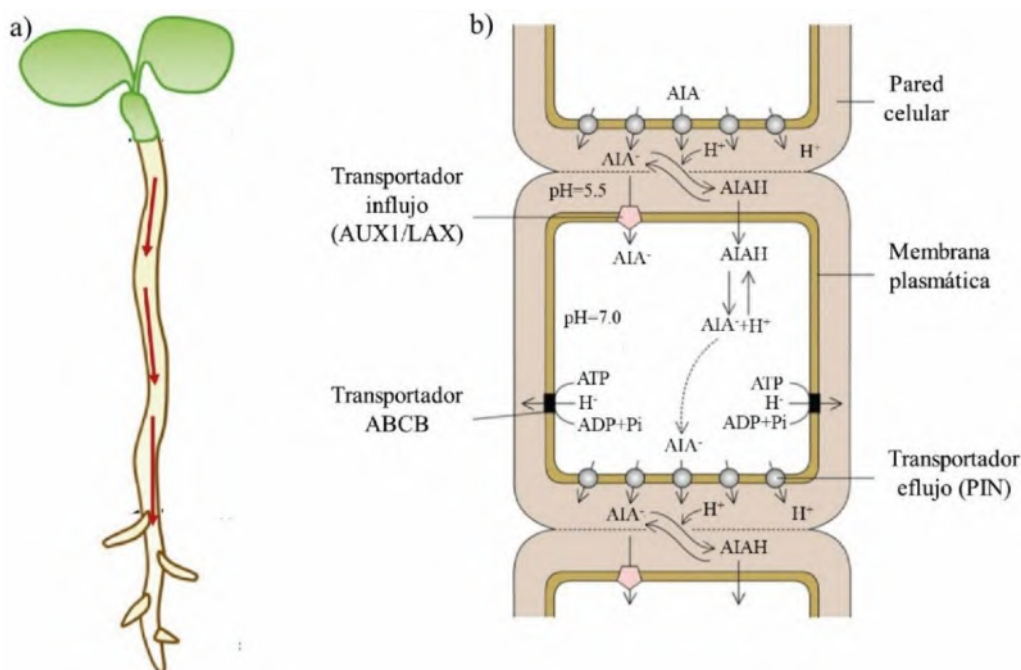


Figura 7. Transporte de las auxinas. a) Distribución de las auxinas a través del floema desde las hojas jóvenes hacia el ápice radicular (flecha roja). b) Las auxinas protonadas AIAH pueden difundir a través de la membrana plasmática, mientras que el AIA^- es transportado dentro de la célula por el acarreador AUX1. En el citosol, el AIAH al disociarse a AIA^- queda atrapado dentro de la célula y solo puede salir por medio de los transportadores PIN y ABCB/PGP (Robert y Friml, 2009; Luschnig y Friml, 2024).

2.7.3. Percepción y señalización de las auxinas

Las auxinas son percibidas por el receptor TIR1 que forma parte del complejo denominado SCF^{TIR1} (proteína 1 asociada a la cinasa de la fase S (Skp1), Cullina (CUL1), proteína 1 de la caja de anillos (RBX1) y una proteína F-box) localizado en el núcleo. Cuando TIR percibe una concentración de las auxinas por debajo de cierto umbral, la respuesta a las auxinas es inhibida por una familia de represores AUX/IAA que secuestran a los factores de transcripción ARF requeridos para la expresión de los genes de respuesta a auxinas (Fig. 8). Mientras que, concentraciones altas de auxinas percibidas por TIR promueven la interacción entre el complejo SCF^{TIR1} /AFB y los represores AUX/IAA, que se convierten en sustratos del complejo SCF^{TIR1} /AFB que los ubiquitinan y envían al proteosoma 26S para su degradación, con la consiguiente liberación de los factores ARF. Los promotores de los genes de respuesta a la auxina contienen elementos (AuxRE) sensibles a las auxinas y que son

reconocidos por los factores transcripcionales ARF (Fig. 8) (Schaller *et al.*, 2015; Cui *et al.*, 2023).

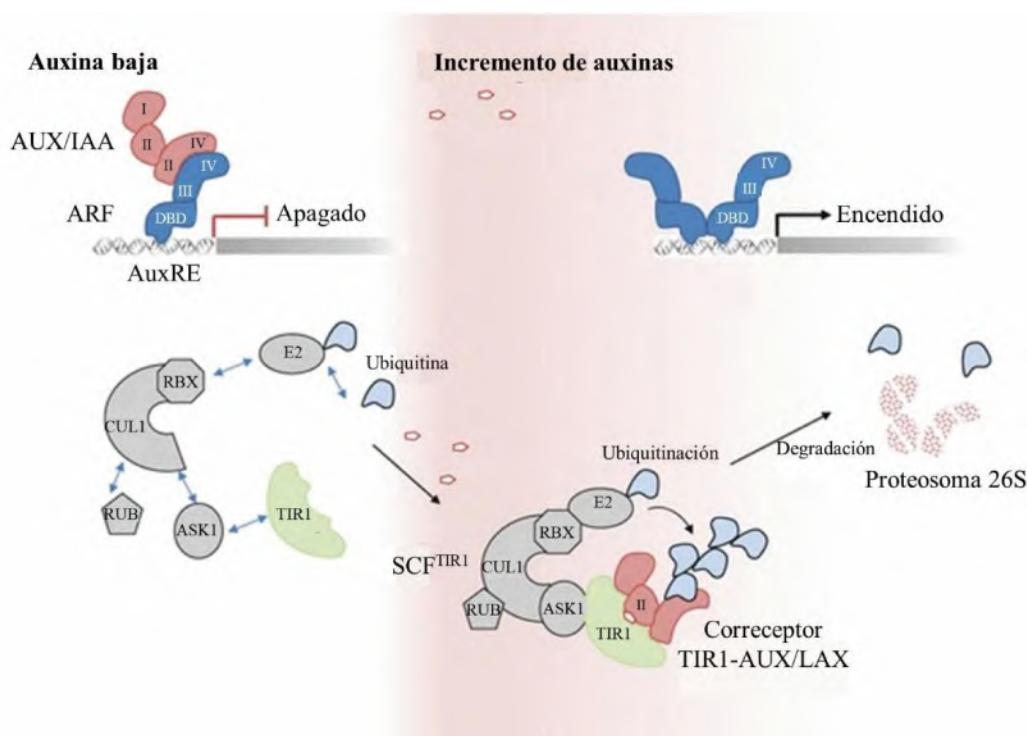


Figura 8. Modelo de la percepción y señalización de las auxinas. En niveles bajos de auxinas, los ARF están secuestrados por los represores AUX/IAA. Mientras que en niveles altos se degradan a los represores y liberan a los ARF, los cuales permiten la transcripción de los genes de respuesta temprana a las auxinas (Mod. Cui *et al.*, 2023).

3. Transporte simplástico a través de los plasmodesmos

El TS se lleva a cabo a través de los plasmodesmos (PD), que son canales nanoscópicos con un diámetro de 2-3 nm, que proporcionan una continuidad citoplasmática al atravesar las paredes celulares de células vecinas (Fig. 9a). Los PD están revestidos por una membrana plasmática (MP) y por una membrana del retículo endoplasmático (RE) comprimido denominado desmotúbulo. Entre la MP y el desmotúbulo se forma un espacio conocido como manga citoplasmática que es la principal vía de tráfico intercelular a través de los PD. Las moléculas que se movilizan a través de este sitio presentan un tamaño de aproximadamente 70 kDa, (Brunkard *et al.*, 2015; Brunkard and Zambryski, 2017). Los componentes que se movilizan a través de los PD son algunos factores de transcripción, mRNA, proteínas del sistema vascular, virus y fitohormonas como el AIA (Crawford and Zambryski, 2001; Peters

et al., 2021). Por otro lado, los PD se clasifican según su génesis en: “primarios” que se forman durante la división celular cuando se establece la nueva pared celular durante la citocinesis (Burch-Smith y Zambryski, 2012; Brunkard *et al.*, 2015) (Fig. 9b). Mientras que los PD secundarios se insertan a una pared celular existente y pueden ser ramificados (en forma de Y o de X). La forma de los PD depende de la etapa de desarrollo de la planta y la especificidad del tejido (Fig. 9b) (Brunkard and Zambryski, 2017).

La membrana plasmática de los PD tiene una composición de proteínas y lípidos específica, en *A. thaliana* dicha membrana está compuesta por balsas lipídicas enriquecidas con esteroides y esfingolípidos con ácidos grasos saturados de cadena larga (Grison *et al.*, 2015), que permiten la unión a remorinas (Simon-Plas *et al.*, 2011) y por proteínas ancladas por medio de las GPI (Fernandez-Calvino *et al.*, 2011). Las proteínas asociadas a los PD que regulan su permeabilidad son: CALLOSE SYNTHASE/ GLUXAN SYNTHASE LIKE (CALS/GSL, por sus siglas en inglés), las β -1,3-glucanasas localizadas en los PD (PdBG, por sus siglas en inglés) las cuales permiten respectivamente, su cierre o apertura. Por otro lado, las proteínas que ayudan al posicionamiento de la callosa sobre el cuello de los PD son: Pd-Associated Callose Binding Proteins (PDCB, por sus siglas en inglés) (Simpson *et al.*, 2009) y Plasmodesmata-Located Protein (PDLP, por sus siglas en inglés) (Lee *et al.*, 2011).

3.1 Dinámica de la apertura o cierre de los plasmodesmos

La estructura de los PD es compleja y dinámica por su apertura o cierre mediante la degradación o deposición de la callosa. La callosa es un polímero de glucosas unidas por enlace glucosídico β ,1-3 que se posiciona sobre el cuello de los PD (Fig. 8a). La síntesis de callosa está regulada CALS/GSL (Vatén *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2014; Bayer y Benitez-Alfonso, 2024), mientras que las proteínas PDCB y PDLP facilitan la unión de la callosa alrededor del PD (Simpson *et al.*, 2009). Dicha deposición del polímero ocasiona una restricción del TS debido a que la callosa empuja a la MP del PD hacia el desmotubúlo lo que causa una contricción de la manga citoplasmática (Tee y Faulkner, 2024). Por otro lado, el grado del movimiento de una molécula a través del TS depende tanto de su propio tamaño, como de la apertura del PD (Zambryski, 2004), formando así lo que se conoce como límite de tamaño de exclusión (SEL, por sus siglas en inglés). El SEL puede ser modulado en respuesta a estreses bióticos/abióticos, pero también varía según el tipo celular y la etapa de

diferenciación del tejido (Xu *et al.*, 2017; Tee *et al.*, 2023). En tanto que las PdBGs contribuyen a la remoción de la callosa y de esta manera restablecen el TS (Benitez-Alfonso *et al.*, 2013).

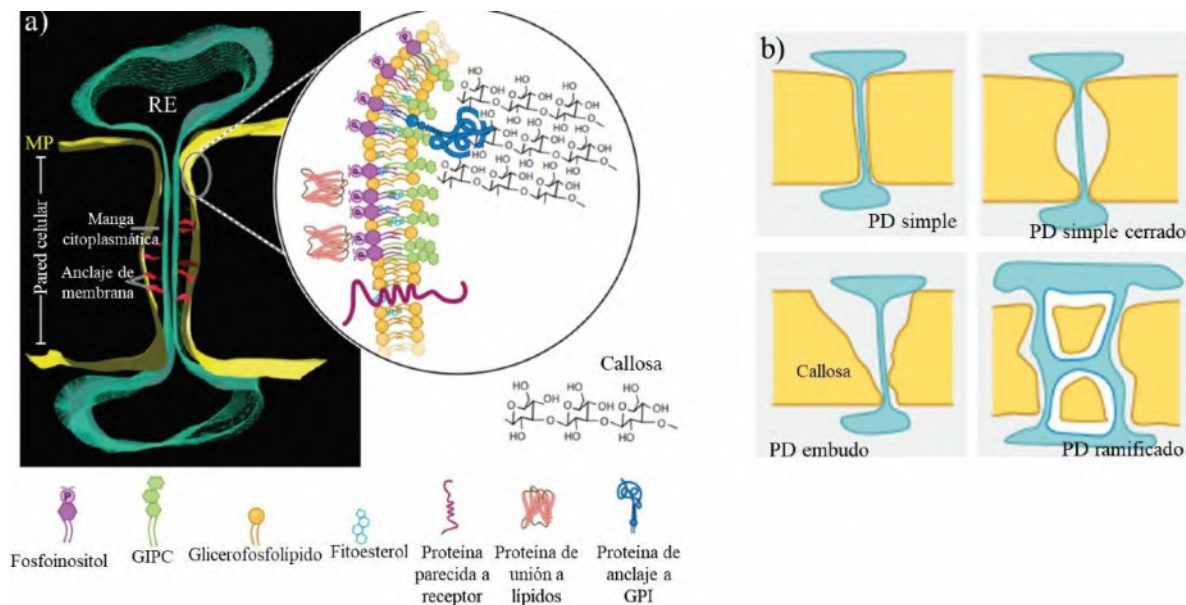


Figura 9. Estructura de los PD. a) Los PD consisten de una manga citoplasmática delimitada por la membrana del RE y de la MP de la célula. En el esquema se pueden ver los diferentes lípidos y proteínas que la conforman. El acercamiento muestra que la callosa se une a la MP. Abreviaturas: GIPC, glicosil inositol fosfo ceramidas; GPI, glicosilfosfatidilinositol. b) Los PD presentan diversas geometrías que varían según el tipo de tejido y la etapa de desarrollo vegetal (Bayer y Benitez-Alfonso, 2024).

3.2 Estructura química y biosíntesis de la callosa

Hace más de 100 años se observó por primera vez mediante una tinción con azul de anilina a la callosa en las placas cribosas del floema, en las células de microsporas y en los tubos polínicos de algunas plantas (Kauss, 1996). Posteriormente, Aspinall y Kessler, 1957 caracterizaron la composición química y la estructura molecular de la callosa en la vid. Se ha reportado que, el genoma de *A. thaliana* contiene 12 genes que codifican para las sintasas de callosa CALS/GSL. Dichos genes se expresan específicamente en diferentes tejidos y etapas de desarrollo o después de la infección por patógenos (Li *et al.*, 2023). Las CALS son proteínas transmembranales de múltiples dominios agrupados en dos regiones y con una parte central hidrofílica hacia el citoplasma. El bucle hidrofílico contiene el sitio catalítico putativo que consta de un sitio de unión a la UDP-glucosa (dominio 1) y otro que une a la

glicosiltransferasa (dominio 2). La polimerización de la callosa comienza con UDP-Glc, que a su vez es sintetizada por la unión del UTP y la glucosa 1-fosfato mediante la UDP-Glc pirofosforilasa. Sin embargo, en el caso de la síntesis de la callosa, debido a que UDP-Glc y Sucrose Synthase (SuS, por sus siglas en inglés) están físicamente asociada y complementa de esta manera su función se ha sugerido que la glucosa de la UDP-Glc proviene de la Sucrose Synthase (SuS, por sus siglas en inglés). Otras proteínas que pueden estar asociadas a las CALS son la actina, tubulina y la UDP-Glc transferasa (UGT-1). Presumiblemente, la función de la UGT-1 es facilitar la transferencia de UDP-Glc generada por SuS y subsecuentemente canalizar la molécula sustrato a la enzima CALS/GSL (Fig. 10).

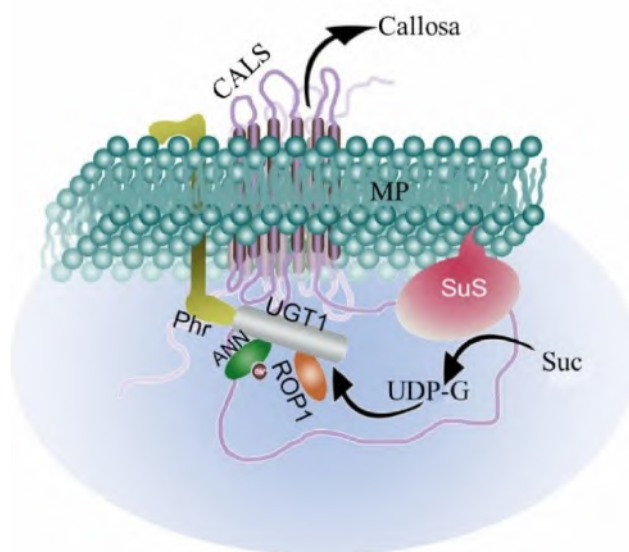


Figura 10. Modelo del mecanismo de la síntesis de callosa. La síntesis de callosa se lleva a cabo por UGT1 que interactúa con CALS, a su vez la proteína Phr interactúa con UGT-1. En el complejo anterior al ser activado por Rop1, la UDP-G sintetizada por la glucosa liberada a partir de SuS se convierte en callosa la cual sale de la célula. Abreviaciones: UGT-1 = UDP-glucosiltransferasa-1, Phr = fragmoplastina, Rop1 = GTPasa tipo Rho1, ANN = anexina, UDP-G = UDP-glucosa, SuS = Sintasa de sacarosa, Suc = Sacarosa (Adhikari *et al.*, 2020).

Como se mencionó antes, la deposición de callosa sobre el cuello de los PD es el mecanismo clásico que regula el cierre de los PD. Sin embargo, Fernandez-Calvino *et al.*, 2011, demostró a través de un análisis proteómico de los PD que otras proteínas también participan en la modulación del TS. Estos autores encontraron 115 proteínas enriquecidas en los PD, las más abundantes presentaron múltiples dominios C2 y otras proteínas una región transmembranal (MCTP). Ambos tipos de proteínas estructuralmente tienen un dominio de anclaje a la MP, con múltiples dominios C2 de unión a lípidos en la región N-terminal y dominios

transmembranales en la región C-terminal. Las MCTP promueven en todas las células eucariontes un intercambio rápido de moléculas de forma no vesicular, el cual es el mecanismo propuesto para que dichas proteínas interactúen con el fosfatidilinositol-4-fosfato (PIP4) para su fijación en el RE. De esta manera, en la MP se forman sitios de contacto atípicos entre los PD que regulan la dinámica de los PD (Pérez-Sancho *et al.*, 2025). Brault y col. 2019, crearon dobles mutantes de *Atmctp3/Atmctp4* que presentaron un fenotipo enano, hojas retorcidas y múltiples inflorescencias. Un análisis radicular de estas plantas, mostraron que el QC y las células de la columela tienen un patrón aberrante (Faulkner y Bayer, 2017; Brault *et al.*, 2019). Posteriormente, Oparka y col. en 1999, al analizar la dinámica de la apertura o cierre de los PD a través del movimiento de la proteína GFP-esporamina, observaron que disminuyó el transporte de GFP en las hojas de la línea *Atmctp3/Atmctp4*, respecto a la Wt.

3.3 Participación del transporte simplástico en la defensa vegetal

La defensa de las plantas contra los patógenos involucra tanto a sistemas inmunitarios autónomos como no autónomos. Los primeros se basan en lo que se conoce como Pathogen-Associated Molecular Pattern (PAMP, por sus siglas en inglés), Triggered Immunity (PTI, por sus siglas en inglés) y Effector-Triggered Immunity (ETI, por sus siglas en inglés) (Yan *et al.*, 2019). La inmunidad (PTI) consiste en el reconocimiento de patrones generados por patógenos, microbios y moléculas formadas durante un daño a través de un receptor del Patter Recognition Receptors (PRR, por sus siglas en inglés) y así activan una respuesta inmunitaria innata (Meisrimler *et al.*, 2021). Los PTI activan a los receptores PRR para iniciar la inducción de la respuesta inmunitaria a través de múltiples procesos biológicos y fisiológicos, como la acumulación de ROS, la activación de la señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK, por sus siglas en inglés) y la regulación transcripcional de genes relacionados con la inmunidad (Yuan *et al.*, 2021). Por otro lado, entre algunos de los PAMP que desencadenan la deposición de callosa se encuentra la flagelina (flg2), la quitina y el quitosano. En el ataque de los hongos a *A. thaliana*, la deposición de callosa requiere de las proteínas con dominio de motivo lisina (LysM), de la CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE 1 (CERK1) y LYSIN MOTIF DOMAIN-CONTAINING

GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOLANCHORED PROTEIN 2 (LYM2) (Faulkner *et al.*, 2013; Gong *et al.*, 2020).

A diferencia del sistema inmunitario autónomo, el no autónomo responde mediante señales que se transmiten de células infectadas por hongos, bacterias e incluso virus a células aún no infectadas a través de la vía simplástica (Yan *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2021) (Fig. 11).

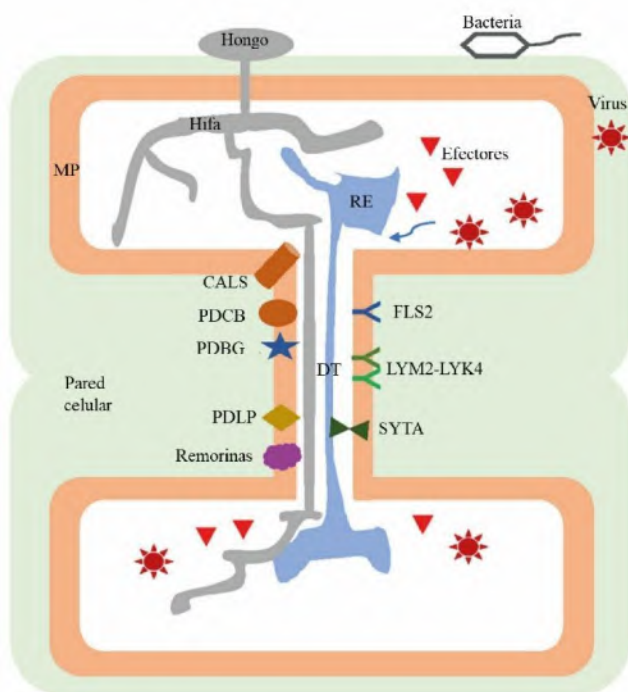


Figura 11. Componentes de los PD involucrados en la respuesta de defensa del hospedero. Los virus, bacterias, hongos e hifas fúngicas se transportan desde las células infectadas a las sanas a través de los PD. Los patógenos para facilitar su movimiento intercelular, inhiben la síntesis de callosa ya sea mediante la inactivación de las CALS, represión de las PDCB, desestabilización de las PDLP y/o reclutamiento de las PDBG. Los virus interactúan con SYTA en la MP para remodelar el PD. Mientras que las remorinas interactúan con la MP del PD e impiden el movimiento de los patógenos. Abreviaciones: SYTA, sinaptotagmina A y LYM2, PROTEÍNA 2 ANCLADA A GPI CONTENIDA EN LYSM; LYK4, LysM (Liu *et al.*, 2021).

Algunos ejemplos de la respuesta de *Arabidopsis* a patógenos son los siguientes: en hojas de *Arabidopsis* inoculadas con *B. cinerea*, el patógeno incremento la deposición de callosa (Nie *et al.*, 2017), al igual que en las hojas de fresa expuestas a interacciones físicas y a los volátiles de *B. methylotrophicus* (Vicente-Hernández *et al.*, 2019). Tee y col., 2023 observaron que la respuesta inmediata de defensa vegetal es el cierre de los PD regulado por diferentes vías de señalización que convergen en la síntesis de callosa.

3.4 Participación del transporte simplástico durante el desarrollo vegetal

A. thaliana tiene una familia de doce miembros de sintasas de callosa *GSL*, Han y col., 2014 observaron que solo la mutante *gsl8* fue incapaz de sintetizar callosa en las hojas de *A. thaliana*, además de que las plantas mostraron un retraso en su desarrollo y en algunas la embriogénesis fue anormal. Debido a que este fenotipo era muy drástico, los autores crearon la línea *gsl8* condicionada a dexametasona (*dsGSL8*), donde evaluaron la respuesta fototrópica del hipocótilo. Estas plántulas condicionadas en presencia de dexametasona fueron incapaces de responder al estímulo de luz, como lo hacen Wt y la mutante *dsGSL8* en ausencia de dexametasona (Fig. 12a). Respecto a la deposición de callosa, observaron que en *gsl8* en ausencia de dexametasona se presentó una distribución asimétrica de callosa en el sitio del doblado del hipocótilo (Fig. 12b-d). Interesantemente, esta distribución asimétrica fue similar a la reportada para las auxinas en el sitio del doblado (Friml *et al.*, 2002).

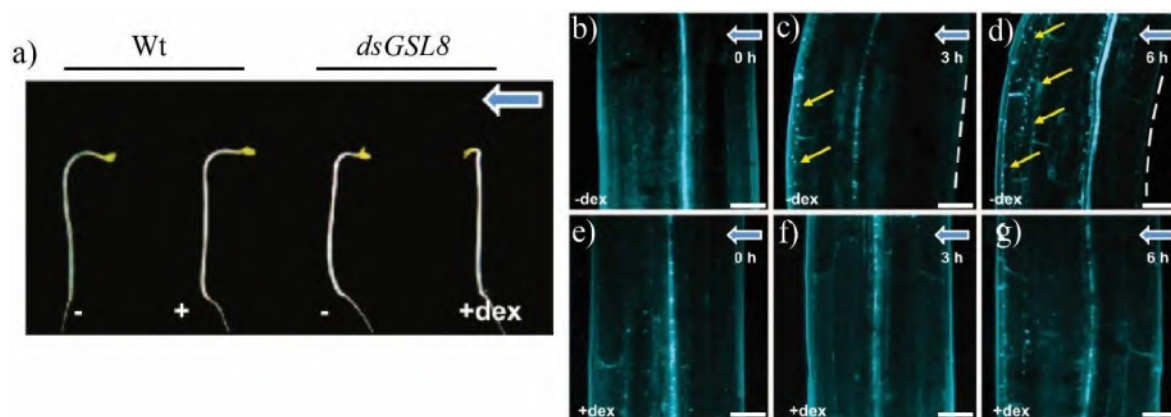


Figura 12. La mutación de *GSL8* impide la respuesta fototrópica del hipocótilo y altera la deposición de callosa. a) Las plántulas *dsGSL8* en presencia de dexametasona son defectuosas en el fototropismo. Tras un pretratamiento de 2 h con dexametasona, se aplicó un estímulo de luz (flecha azul) a plántulas etioladas de 3 días. b-g) Deposición de callosa en sitio de doblado en la respuesta fototrópica de los hipocótilos de *dsGSL8*; las flechas amarillas indican la distribución asimétrica de la callosa en los hipocótilos (Mod. Han *et al.*, 2014).

Por otro lado, Vatén y col. en 2011, analizaron tres mutantes de ganancia de función en *CALS3* de *Arabidopsis*: *cals3-1d*, *cals3-2d* y *cals3-3d*, denominadas *cals3-d* que presentaron

una RP corta, fenotipo que correlaciono con la acumulación de callosa (Fig. 13a). En etapas tempranas del desarrollo de las RL, las mutantes *cals3-d* presentaron mayor acumulación de callosa. Estos autores también crearon la doble mutante de ganancia de función condicionada a estradiol *icals3m* que porta dos mutaciones *cals3-1d* y *cals3-2d*. Esta línea mutante se expresó bajo el promotor *CALS3* específico del floema y *CRE1* de la estela, creando a las líneas: *pCALS3:icals3m* y *pCRE1:icals3m* las cuales presentaron altos niveles de callosa en la pared celular de las células de la RP (Fig. 13b-e).

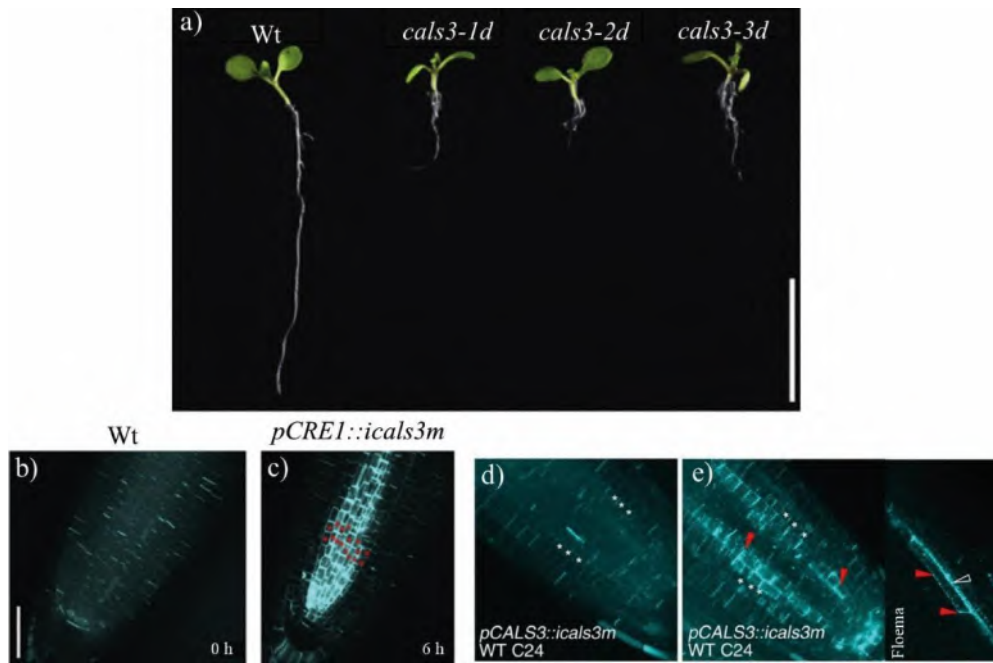


Figura 13. CALS3 regula el desarrollo de la raíz de *A. thaliana*. a) Fenotipo de plántulas mutantes en *CALS3* de ocho días de edad. b-e) Raíz primaria de *A. thaliana* Wt, *pCRE1:icals3m* y *pCALS3:icals3m* teñidas con azul de anilina (Mod. Vatén *et al.*, 2011).

La participación del TS se investigó en la hiponastia de las hojas de *A. thaliana*, proceso que depende del PAT desde la punta de la hoja hacia el peciolo, lo que resulta en el levantamiento de las hojas para evitar la sombra de plantas vecinas (Li *et al.*, 2024). Li y col, 2024 observaron que, para que se lleve a cabo la hiponastia se incrementa la difusión de moléculas a través del TS en las células de la endodermis, del parénquima vascular y de la epidermis abaxial de las hojas. El TS fue analizado en las mutantes *gsl8* de *A. thaliana*, las cuales al ser inducidas con AIA exógeno presentaron una disminución del transporte de auxinas hacia el peciolo que ocasionó una reducción del ángulo del levantamiento que correlaciono con

niveles bajos de callosa y alta permeabilidad de los PD (Fig. 14a). Por otra parte, las plantas *gsl8* presentaron un TS de auxinas reducido ocasionado por deficiencia de la canalización de las auxinas hacia las células de la epidermis donde ocurre el levantamiento del peciolo. Por otra parte, la triple mutante del PAT (*pin3pin4pin7*) presentó un levantamiento de la hoja menor respecto a *gsl8* (Fig. 14a). La influencia del PAT en este fenómeno se estudió con el inhibidor del PAT, el NPA (Ung *et al.*, 2022). Las plantas Wt al ser tratadas con NPA mostraron una reducción en la respuesta del ángulo del hipocótilo, similar a las mutantes *pin3pin4pin7*, mientras que las *gsl8* fueron las más afectadas (Fig. 14b). Los autores demostraron que la interrupción combinada del PAT y del TS de las auxinas reduce la respuesta de la hiponastia.

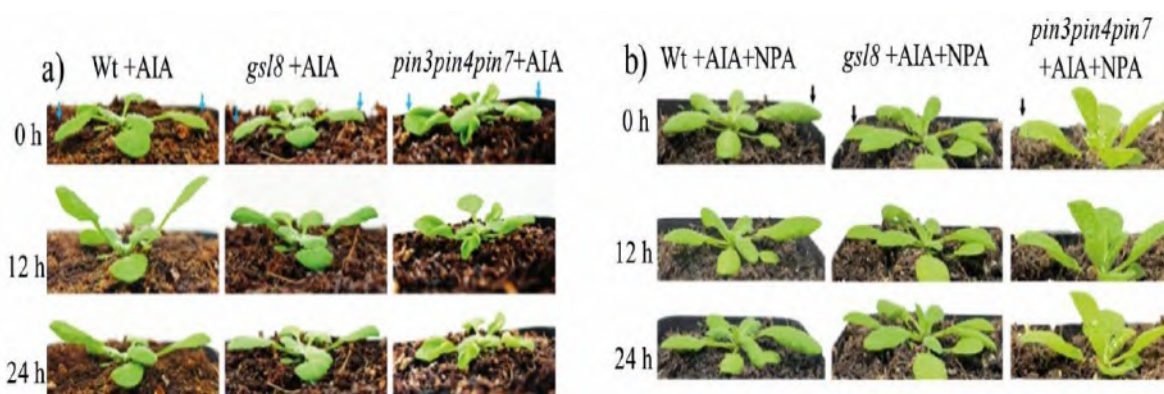


Figura 14. Respuesta de hiponastia en plantas de Wt, *gsl8* y *pin3pin4pin7* de *A. thaliana*. a) La hiponastia observada en plántulas Wt, *gsl8* y *pin3pin4pin7* 12 y 24 h después de la inducción con la aplicación de AIA. las flechas azules indican el sitio de aplicación de las auxinas. b) El NPA inhibe la hiponastia en plántulas Wt, *gsl8* y *pin3pin4pin7* de veintidós días de edad. Las flechas negras indican la aplicación del NPA (Mod. Li *et al.*, 2024).

3.4.1 Proteínas localizadas en los plasmodesmos que regulan el desarrollo de *A. thaliana*

El genoma de *A. thaliana* contiene once genes que codifican para las proteínas PDCB cuya estructura comprende un dominio X8 en el extremo N-terminal, una región no estructurada en medio y un motivo de unión a GPI en el C-terminal (Elortza *et al.*, 2003). Las PDCB se unen a la callosa a través de su dominio X8 y con ello disminuyen la permeabilidad de los PD. Se ha propuesto que las PDCB funcionan como ancla entre la MP de los PD y la callosa depositada sobre el cuello del canal para estabilizar al polímero en el PD, lo cual a su vez regula el SEL. Otra función de las PDCB es proteger al polímero contra la actividad de

degradación de las PdBG (Simpson *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2019). Salmon y Bayer en 2013, sugirieron que las PDCB estabilizan los micro dominios de las balsas lipídicas que se localizan en la MP de los PD creando configuraciones fisicoquímicas de la pared celular necesarias para la correcta localización y funcionamiento de las PDCB las cuales regulan la homeostasis de la callosa en los PD. Las PDCB1, 2 y 3 que se localizan principalmente en brotes apicales y hojas jóvenes (Simpson *et al.*, 2009) funcionan en la liberación de la latencia de las yemas apicales de álamo. Mohamed y col. en, 2010, reportaron que el álamo entra en un estado latente al disminuir el fotoperiodo por la oclusión estructural de los PD en el ápice, lo que aísla al meristemo apical (Rinne *et al.*, 2011). Este fenómeno evita la continuidad simplástica de los factores de transcripción implicados en la floración: FLOWERING LOCUS T (FT, por sus siglas en inglés) y CENTRORADIALIS-LIKE1 (CENL, por sus siglas en inglés). La liberación de la latencia de la yema apical se desencadena por el frío y por la presencia del ácido giberélico 4 (GA4) que reestablece la conectividad simplástica en el meristemo apical a través de la activación de las PdBg y la eliminación de las PDCB (Sabir *et al.*, 2025).

Respecto al desarrollo radicular, se ha reportado que las proteínas PDCB modulan la formación y el patrón de las RL (Benitez-Alfonso *et al.*, 2013; Maule *et al.*, 2013). La sobreexpresión de PDCB1 aumentó significativamente la densidad de las RL de *A. thaliana* por la inducción ectópica de los primordios de las raíces laterales (PRL) (Fig. 15a). Este fenotipo correlaciona con la expresión ectópica de *GATA23*, proteína que controla la especificación de las células fundadoras de las RL (Fig. 15b-d) (De Rybel *et al.*, 2010). Con estos resultados, Benitez-Alfonso *et al.*, 2013 mostraron que PDCB1 regula la iniciación y el patrón de las RL a través de la homeostasis de callosa y la permeabilidad de los PD. Por otra parte, Maule y col. (2013), identificaron a la PDCB1, a partir de un cribado de proteínas inducidas por auxinas e implicadas en la homeostasis de callosa y demostraron que la expresión de *PDCB1* en los PRL en las etapas de desarrollo III y IV se regula por la adición exógena de auxinas.

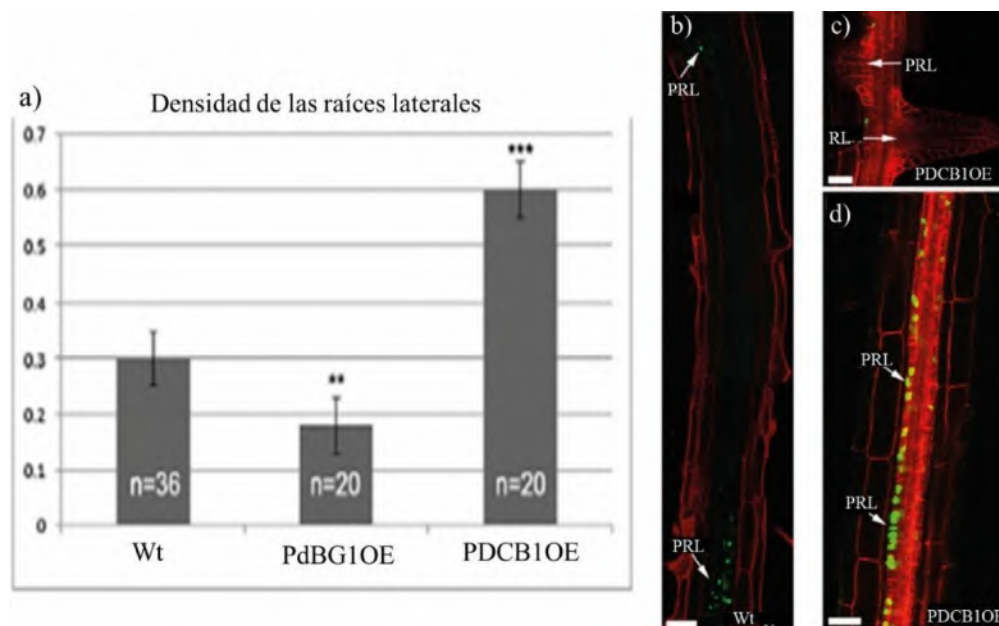


Figura 15. La sobreexpresión de *PDCB1* incrementa los sitios de iniciación de las raíces laterales. a) Densidad de las raíces laterales de plántulas PdBG1OE y PDCB1OE. **b-d)** Expresión de *GATA* en las RL de plántulas *PDCB1OE* (Mod. Benitez-Alfonso *et al.*, 2013).

Otras proteínas que regulan la deposición de callosa sobre los PD son las PDLTP, se localizan en los PD y presentan una estructura similar a receptores ricos en cisteína (CRK) (Thomas *et al.*, 2008). El genoma de *A. thaliana* contiene ocho genes que codifican para las proteínas PDLTP1-PDLTP8, que son estructuralmente similares (Lee *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2017). Las PDLTP se componen de una región citoplasmática, una transmembranal y un ectodominio, que contiene a su vez presenta dos dominios de función desconocida (DUF26). DAF26 comúnmente se encuentra en los receptores CRK y muestra un motivo de cisteína conservado Cx₈Cx₂C (Thomas *et al.*, 2008). Específicamente, PDLTP5 colocaliza en la MP de la célula en la región central del PD. Por otro lado, Amari y col., en 2010 reportaron que las PDLTP5 funcionan como un andamio o receptor para el movimiento de proteínas virales a través de los PD y pueden presentar redundancia funcional con otras PDLTP. Sin embargo, ha sido reportado que estas proteínas no tienen función redundante y que su expresión y función es tejido específico (Wang *et al.*, 2020). Por otro lado, la pérdida de función de PDLTP5 ocasiona la apertura del cuello del PD, además de aumentar la susceptibilidad a patógenos y también altera la resistencia sistémica adquirida (Lee *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013). Por el contrario,

Carella y col. (2014), observaron que la sobreexpresión de PDLP5 restringe el movimiento de moléculas y aumenta la inmunidad a los patógenos.

Lee y col. (2011), crearon líneas mutantes y de sobreexpresión de *PDLP5*, donde la mutante no presentó cambios en el desarrollo vegetal (Fig. 16b) y en la línea de sobreexpresión *35S:PDLP5* se observó una disminución del desarrollo, así como clorosis en las hojas de roseta, respecto a la Wt (Fig. 16a).

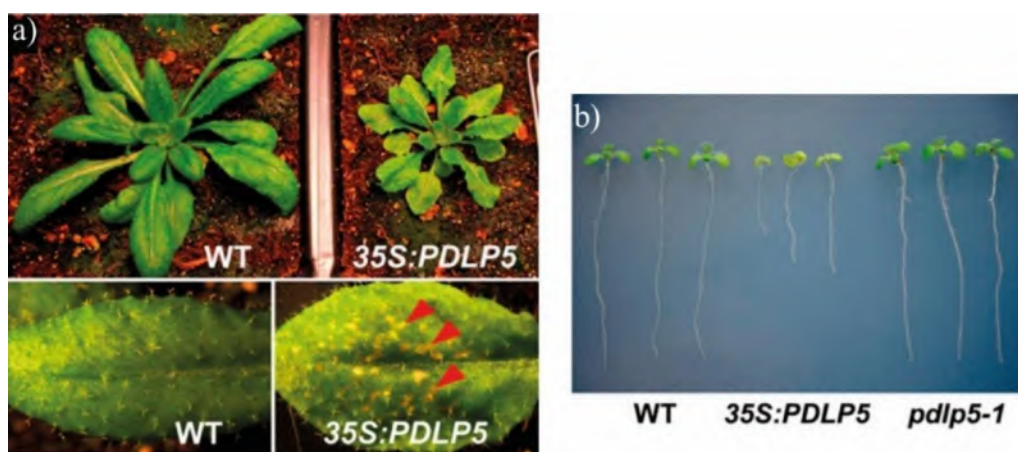


Figura 16. PDLP5 participa en regulación del desarrollo vegetal. a) Las plántulas *35S:PDLP5* presentan clorosis, así como lesiones (cabeza de flecha) en las hojas. **b)** Fenotipo de plántulas mutantes y de sobreexpresión de *PDLP5* de 8 días de edad crecidas en MS 0.2X e incubadas en fotoperiodo (Mod. Lee *et al.*, 2011).

Respecto al desarrollo radicular, Sager y col. (2020), reportaron que en las primeras etapas de desarrollo de los PRL, la proteína PDLP5 se localiza en la endodermis, posteriormente en el córtex y en la epidermis cuando la RL ha emergido. Este patrón de localización fue similar al del transportador de influjo de las auxinas *AUX/LAX*, lo que les permitió sugerir y posteriormente comprobar que la expresión de *PDLP5* depende de las auxinas suministradas por la parte aérea de la planta (Fig. 17a). Posteriormente, estos mismos autores reportaron que las mutantes *pdlp5-1 DR5:GUS* no presentaron cambios en la longitud de la raíz primaria (LRP), pero si un aumento de las RL largas, mientras que en la línea *PDLP5OE DR5:GUS* se observó una disminución en la LRP y RL escasas y cortas (Fig. 17b). Estos autores también demostraron que estos fenotipos se debían a que en la mutante *pdlp5-1 DR5:GUS* se aceleró y en *PDLP5OE DR5:GUS* se retrasó el desarrollo de los RPL (Fig. 17c).

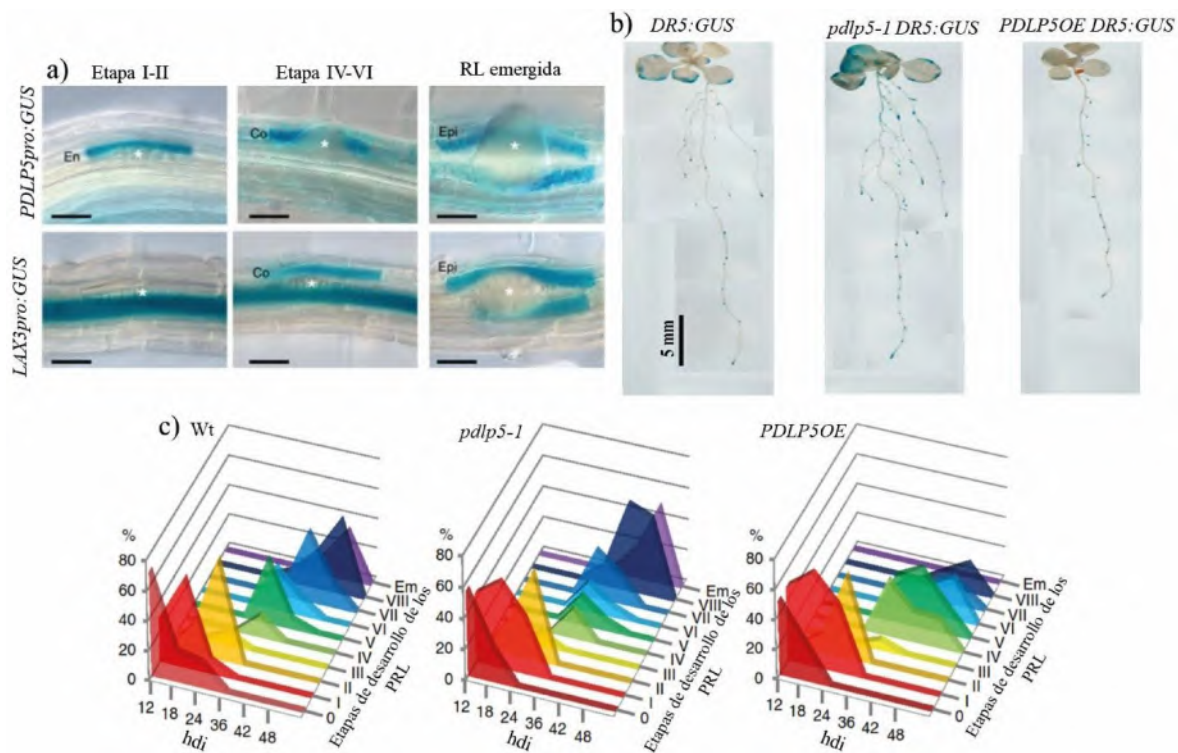


Figura 17. PDL5 regula el desarrollo de las RL de *A. thaliana*. a) Expresión de *PDL5* durante el desarrollo de los PRL. Las plántulas fueron tratadas con X-Gluc dos días después del corte del brote. Barras de escala, 50 μ m. Los asteriscos indican el centro del PRL. b) Fenotipo radicular de plántulas *pdlp5-1 DR5:GUS* y *PDL5OE DR5:GUS* de once días de edad crecidas en MS 0.5X e incubadas en luz continua. c) Evaluación del desarrollo de los PRL en plántulas de 4 días de edad después de una gravi-estimulación. Eje x, horas después de la inducción (hdi) y eje z, distribución de los PRL en diferentes etapas de desarrollo (Mod. Sager *et al.*, 2020).

Li y col. (2024), crearon líneas de sobreexpresión de *PDL5-HF* y *PDL6-HF* donde observaron una hiper acumulación de almidón en hojas maduras y un retraso en el desarrollo de las plantas. Además, las plántulas *PDL5-HF* mostraron una mayor hiper acumulación de almidón por la restricción del TS en las hojas (Fig. 18a). En estas líneas, el TS fue analizado a través del movimiento del diacetato de 5(6)-carboxifluoresceína (CFDA) (Huang *et al.*, 2019). El fluoróforo se aplicó en los cotiledones de plántulas *PDL5-HF* y Wt de 7 dde, donde observaron una disminución de la señal de CFDA, respecto a la Wt. Posteriormente, estos autores crearon líneas mutantes de *pdlp5* y *pdlp6* que no presentaron cambios en el fenotipo de las plantas ni en el desarrollo vegetativo ni en el contenido de almidón, lo cual lo atribuyeron a la redundancia funcional de las PDLP. Para determinar la expresión celular específica de las proteínas *PDL5* y *PDL6* los autores crearon las líneas *ProPDL5:PDL5-YFP* y *ProPDL6:PDL6-YFP*, las cuales al ser observadas bajo

microscopia confocal mostraron que la expresión de *PDLP5-YFP* se detectó principalmente en las células de la epidermis, mientras que *PDLP6-YFP* en la vasculatura de las hojas. Respecto a la RP, la expresión de *PDLP6-YFP* se localizó en la vasculatura y *PDLP5-YFP* en la epidermis y el córtex (Fig.18c). Además, estos investigadores mostraron la expresión de *PDLP5* y *PDLP6* (Pro*PDLP5* o Pro*PDLP6*) fusionada a *GUS*, la tinción mostró que *PDLP5* estaba activo en la epidermis y el mesófilo de la hoja, así como en la epidermis y el córtex de la raíz y *PDLP6* en el floema de la hoja y de la raíz (Fig. 18c). Finalmente, en ensayos de inmunoprecipitación *in vitro* observaron en los elementos cribosos del floema que *PDLP6* interacciona con *CALS7* y *SUS6* y de esta manera regulan el desarrollo vegetal y la acumulación de almidón en *A. thaliana*.

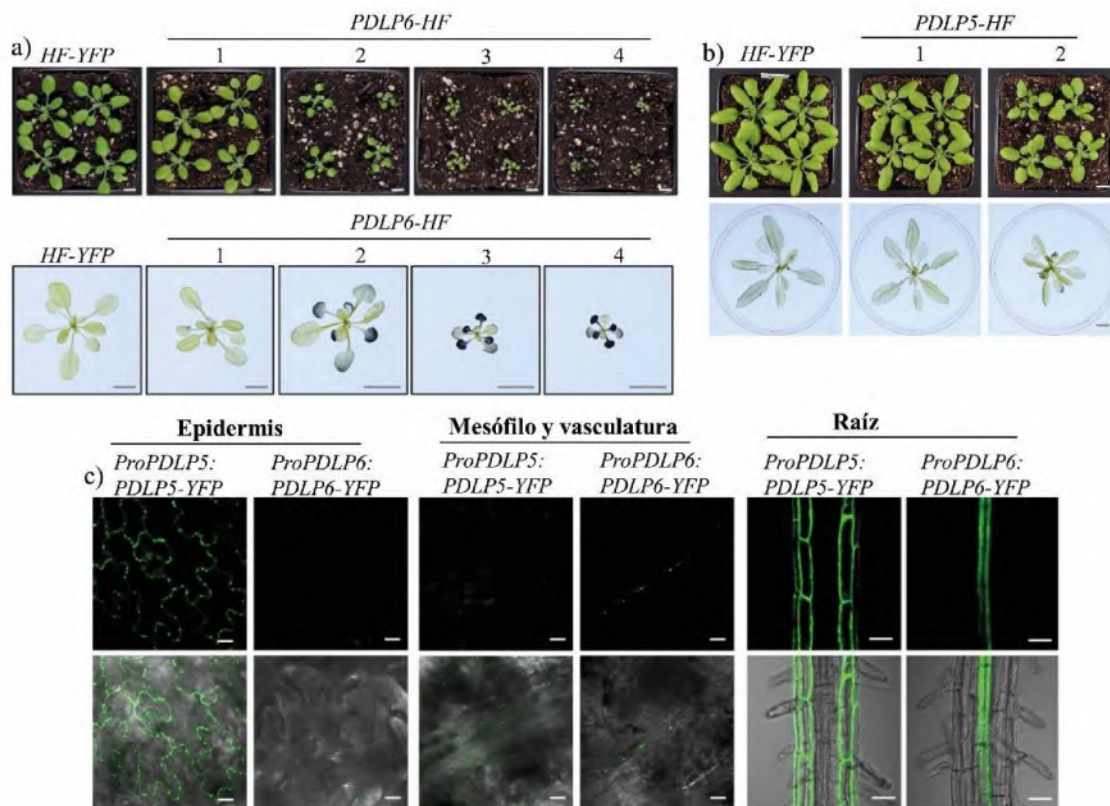


Figura 18. La sobreexpresión de *PDLP5* y *PDLP6* causa un retraso en el crecimiento y sobre acumulación de almidón en *A. thaliana*. **a)** Fenotipo vegetativo y acumulación de almidón (tinción de Lugol) de plántulas de *PDLP6-HF* de *A. thaliana* de tres semanas de edad crecidas en fotoperiodo. **b)** Fenotipo vegetativo y acumulación de almidón de plántulas de *PDLP5-HF* de *A. thaliana* de tres semanas de edad crecidas en fotoperiodo. **c)** Expresión celular específica de *PDLP5-YFP* y *PDLP6-YFP* en plántulas de dos semanas de edad (Mod. Li *et al.*, 2024).

Como mencionamos antes, se ha propuesto que las auxinas además de movilizarse a través del PAT lo hacen también mediante el TS (Gao *et al.*, 2020; Mellor *et al.*, 2020). Mellor y col., 2020, desarrollaron un modelo multicelular computacional *in silico* de la raíz de *Arabidopsis* para comparar el nivel de auxinas predicho con los datos experimentales de la línea reportera *DR5:VENUS*. Cuando el modelo *in silico* considero al PAT, los resultados mostraron discrepancias en el nivel de auxinas del periciclo, endodermis y columela. Sin embargo, las discrepancias desaparecieron cuando el modelo *in silico* considero tanto al PAT como al TS (Fig. 19). Con estos resultados los autores propusieron que se debe analizar ambos tipos de transporte en cualquier proceso de desarrollo vegetal donde esté involucrado el movimiento de las auxinas.

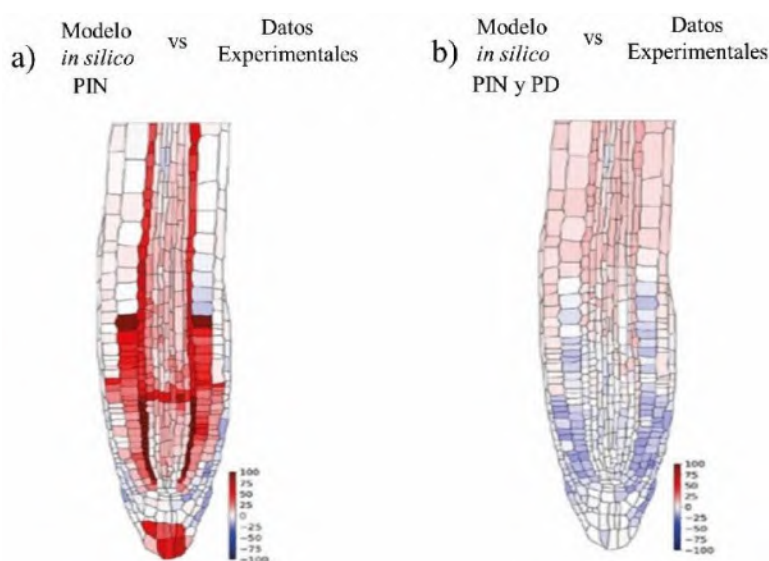


Figura 19. Distribución de las auxinas regulada por el transporte polar de auxinas y el transporte simplástico en la raíz primaria de *A. thaliana*. a) Discrepancias (color rojo y rosa) del nivel de auxinas predicha y observada en *DR5:VENUS* al considerar al PAT. b) Concordancia (color azul y blanco) del nivel de auxinas considerando al PAT y al TS (Mod. Mellor *et al.*, 2020).

3. La rizosfera: nicho de actividad microbiana

La raíz de la planta está rodeada por un volumen de suelo denominado rizosfera, la cual es un entorno dinámico donde se producen interacciones complejas con los microorganismos del suelo que suelen estar presentes en 1×10^{11} células/g de raíz, con más de 30 000 especies (Chen y Lui, 2024). En la actualidad se conoce que la rizosfera no es una región de tamaño o forma definida, sino que sus propiedades químicas, biológicas y físicas cambian tanto radial como longitudinalmente a lo largo de la raíz. La rizosfera está compuesta por tres zonas definidas según su proximidad a la raíz: i) la endorrizosfera que incluye el córtex y la

endodermis de la raíz sitio donde los microorganismos y algunos cationes ocupan el espacio apoplástico, ii) el rizoplano, que es la zona media adyacente a la raíz e incluye a la epidermis y el mucilago radicular y iii) la ectorrizosfera es la capa más externa que va desde el rizoplano hacia el suelo. En la rizosfera se encuentran microorganismos como: bacterias, arqueas, hongos, nematodos, protozoos, invertebrados y otros organismos que, al interactuar entre sí, pueden proporcionar beneficios para la salud de la planta y servir como reservorios de los nutrientes (Hartmann *et al.*, 2015). Los microorganismos pueden adherirse a las raíces y permanecer en este sitio temporalmente o ser arrastrados hacia otra ubicación. Los gradientes y abundancia de los microorganismos presentan tendencias opuestas: la abundancia y la actividad disminuyen desde las raíces hasta el suelo, mientras que la diversidad desde las raíces hasta el suelo aumenta (Fig. 20) (Kuzakov y Razavi, 2019).

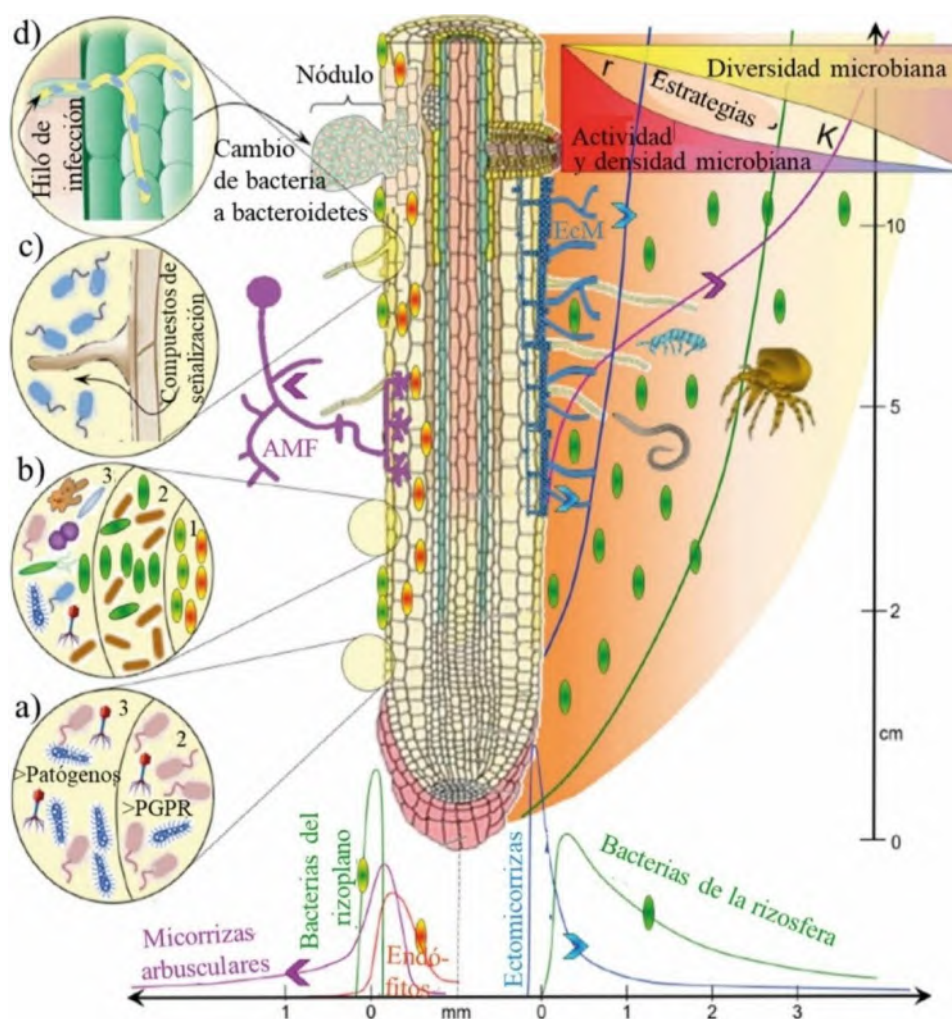


Figura 20. Distribución de los microorganismos en la rizosfera. Diversos grupos de microorganismos a lo largo de la raíz incluyen: micorrizas arbusculares (violeta, AMF) y ectomicorrizas (azul, EcM); bacterias endófitas en el rizoplasma y la rizosfera (verde). **a)** Mayor densidad de PGPR en comparación con los patógenos en 2) la rizosfera y 3) a la inversa en el suelo. **b)** Abundancia de diversos grupos microbianos en 1) en el rizoplasma, 2) en la rizosfera y 3) en el suelo. **c)** Liberación de compuestos de señalización de *Rhizobium* y otras PGPR. **d)** Infección de los pelos radicales por *Rhizobium* y formación de nódulos. Los números en las lupas reflejan: 1) el rizoplasma, 2) la rizosfera, 3) el suelo (Mod. Kuzyakov y Razavi, 2019).

Los microorganismos pueden interactuar, ya sea con la raíz de la planta huésped (raíz-microbio) o entre ellos (microorganismo-microorganismo) (Shi *et al.*, 2022). Las diferentes interacciones raíz-microbio se clasifican como: i) antagonismo, que consiste en la competencia entre los microorganismos, ii) benéficas y iii) neutrales, establecidas por los microorganismos para aprovechar los exudados de la raíz como alimento sin dañar a la planta (Chepsergon y Moleleki, 2023).

Los microorganismos que se encuentran en la rizosfera son: micorrizas, *rhizobium*, PGPR y patógenos. Los tres primeros establecen interacciones benéficas con las plantas y pueden clasificarse en tres grupos: i) responsables de la nutrición vegetal, ii) estimulan indirectamente el crecimiento de las plantas al prevenir la acción de los patógenos y iii) responsables de la promoción directa del crecimiento vegetal. Por otra parte, los exudados radiculares son compuestos orgánicos que liberan las raíces hacia la rizosfera, los cuales desempeñan una función importante en la composición del microbioma de esta capa de suelo (Chen y Lui, 2024). Específicamente, la raíz secreta en los exudados moléculas como: ácidos orgánicos que, al disminuir el pH, facilitan la solubilización del fósforo del suelo y lo hacen más disponible a las plantas; sacarosa que sirve como fuente de carbono para la bacteria y fitohormonas como el AIA, CK, ABA, el GA y el etileno (Fig. 21).

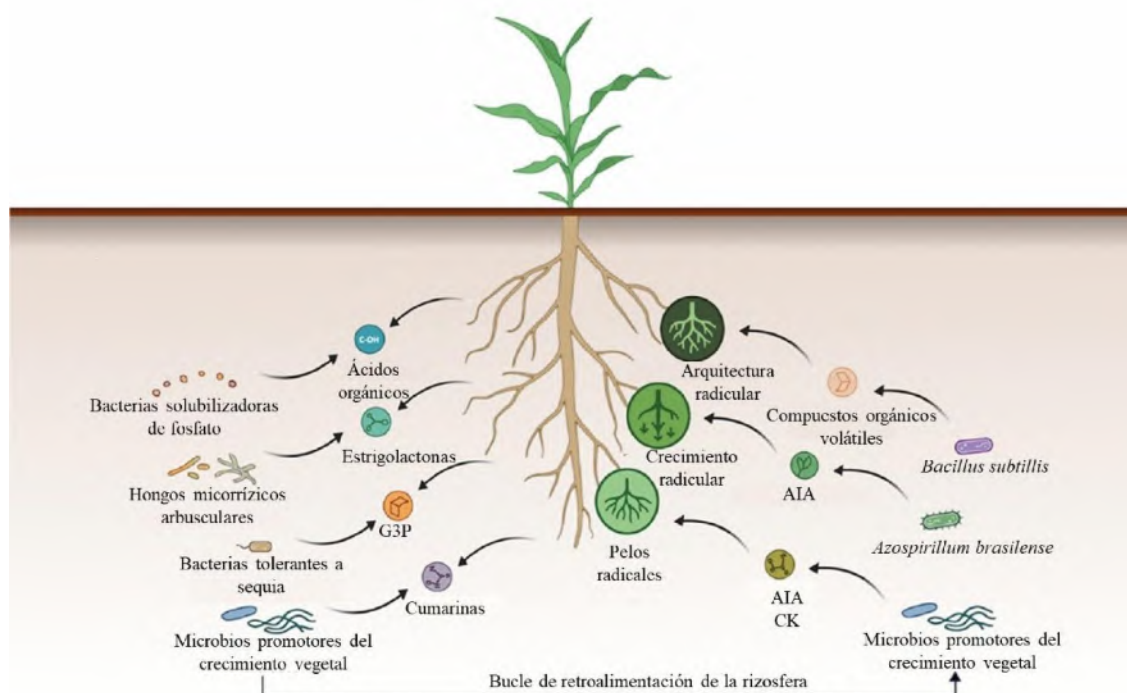


Figura 21. Circuito de retroalimentación entre la rizosfera y los exudados radiculares. Los exudados radiculares incluyen a los ácidos orgánicos, estrigolactonas, glicerol-3-fosfato (G3P) y cumarinas, algunos de los cuales reclutan a los microorganismos benéficos. A su vez, estos microorganismos influyen sobre el desarrollo del SR mediante la producción de compuestos orgánicos volátiles, fitohormonas (AIA y CK) y otros metabolitos. Los microorganismos benéficos representativos son *B. subtilis* y *A. brasilense*, los cuales incrementan el crecimiento y la formación de pelos radicales (Mod. Araujo *et al.*, 2025).

4.1 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)

La estimulación del desarrollo vegetal y la protección de las plantas a las enfermedades es mitigada por las PGPR. Las PGPR se clasifican en dos grupos de acuerdo a su cercanía a la raíz: intercelulares y extracelulares. En el primer grupo se encuentran las bacterias endofíticas que deben penetrar al interior de la raíz para poder beneficiar a plantas; ejemplos de estos géneros son: *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium* y *Rhizobium*. Dentro de ellos el de mayor importancia agrícola es *Rhizobium*, el cual forma nódulos en las raíces de las leguminosas que permiten la fijación del nitrógeno atmosférico (Masciarelli *et al.*, 2014). Por otro lado, algunos géneros de PGPR que coloniza la raíz son: *Chromobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Caulobacter*, *Flavobacterium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Klebsiella* sp, *Burkholderia* y *Micrococcous* (Gusain y Bhandari, 2019; Chamkhi *et al.*, 2021). Algunas de estas PGPR se han usado como biofertilizantes, fitoestimuladores, rizorremediadoras y biopesticidas. El efecto de las PGPR sobre la estimulación del desarrollo vegetal se da a través de mecanismos directo e indirecto. El primero facilita la adquisición de hierro, nitrógeno y fosfato del ambiente o sintetizan auxinas, citocininas y etileno (Fig. 20). Mientras que, en los mecanismos indirectos las bacterias limitan o previenen el daño a las plantas por agentes patógenos que incluyen a las bacterias, hongos y nematodos (Oluwaseyi *et al.*, 2017; Motte *et al.*, 2019).

4.1.1 Características de la PGPR *Azospirillum*

Azospirillum son bacterias gran negativas de vida libre que no forma esporas y crecen en condiciones macroaerofilas en forma de bastón o espiral. Además, es el grupo de PGPR mejor caracterizado, ya que puede asociarse con la raíz de cereales, tomate, pimiento, algodón y con la microalga *C. sorokiniana* (Assmus *et al.*, 1995; Pereg *et al.*, 2016). Para que se establezca *Azospirillum* en la raíz de la planta, el primer paso es la fijación de bacteria para impedir la movilidad que presenta *in vitro* (Alexandre *et al.*, 2000), en suelo (Bashan y Levanovy, 1987) y en agua (Puente *et al.*, 1999). Una vez que se establece la asociación, la rizobacteria forma quistes y se moviliza hacia la raíz a través de los flagelos polares. Bashan

y de-Bashan 2010, reportaron que *Azospirillum* modifica preferencialmente la raíz para incrementar la toma de agua y nutrientes. Este efecto ha sido relacionado a los cambios en el crecimiento, arquitectura y volumen de la planta para mejorar los procesos metabólicos requeridos durante su ciclo de vida. Durante la interacción con las plantas, *Azospirillum* utiliza los exudados de la raíz como fuente de carbono y a su vez promueve el crecimiento a través de diferentes mecanismos que incluyen la secreción de fitohormonas, la solubilización de macro y micronutrientes como: el fósforo, hierro y la fijación del nitrógeno entre otros factores (Spaepen *et al.*, 2009).

La primera evidencia de la fitoestimulación por *A. brasilense* se observó en plántulas de mijo perla y sorgo, la cual fue similar a la obtenida con la aplicación exógena de AIA. El modelo propuesto por el cual las fitohormonas sintetizadas por *A. balduinii* inducen cambios morfológicos en la planta es el siguiente: disminuye de la elongación de la raíz primaria, aumenta el desarrollo de las raíces laterales y adventicias e incrementa el número de pelos radicales. Estos cambios significativamente incrementan la superficie y el volumen radicular que mejora la adquisición de agua y nutrientes (Spaepen *et al.*, 2014). Dichas modificaciones del sistema radicular se dan en respuesta a las auxinas sintetizadas por la rizobacteria. Sin embargo, Mora y col. (2023), sugieren que otras moléculas o componentes producidos por la bacteria podrían inducir una respuesta similar a la del AIA.

Por otro lado, la asociación de *Azospirillum* con las plantas mejora significativamente el crecimiento, el desarrollo y en muchos casos el rendimiento del grano en condiciones de campo (Cassán *et al.*, 2020). Por tal razón, la rizobacteria es ampliamente utilizada como inoculante en la producción de cereales en Sudamérica, en Brasil es empleada en leguminosas y soya. Los cambios en el crecimiento vegetal observados por la inoculación con *Azospirillum*, también mejoran la capacidad bacteria para enfrentar el estrés abiótico en condiciones de campo (Okon y Labandera-Gonzalez, 1994). En campo se han realizado distintas investigaciones en maíz y trigo inoculados con *A. brasilense*, donde la rizobacteria incremento el rendimiento del grano entre 66 y 80%, respecto al control (Díaz-Zorita y Fernández-Caniggia, 2009; Díaz-Zorita *et al.*, 2015). Por otro lado, Kazi *et al.*, 2016, demostraron que en la inoculación con *Azospirillum* primero aumenta la población de bacterias en la rizosfera durante las primeras etapas de interacción con las plantas y posteriormente se promueven los cambios del sistema radicular.

Azospirillum además de ser utilizada como bioinoculante, también es un biorremediador, Tugarova y col. (2013), reportaron una reducción de selenio (IV) a selenio (0). Mientras que, Arora *et al.*, 2016, también evaluaron su potencial de biorremediación junto con hongos en *Panicum virgatum* (pasto varilla), sobre suelos contaminados con plomo y cadmio

5. Justificación

La rizobacteria *A. baldaniorum* Sp245 promueve el desarrollo de las raíces laterales de *Arabidopsis* a través del transporte polar de auxinas y recientemente se ha demostrado que las auxinas también pueden movilizarse por medio del transporte simplástico que se lleva a cabo a través de los plasmodesmos. El transporte simplástico puede ser controlado directamente por la síntesis o degradación de la callosa o indirectamente por proteínas como las PDPL5. El transporte simplástico juega un papel clave en una plétora de procesos de desarrollo vegetal que van desde la regulación del fototropismo, de la hiponastia hasta el desarrollo de las raíces laterales. Por lo antes mencionado, en el presente estudio analizamos si el transporte simplástico de las auxinas participa en la estimulación del desarrollo de las raíces laterales durante la interacción *A. thaliana*- *A. baldaniorum* Sp245.

6. Hipótesis

En el desarrollo de las raíces laterales de *A. thaliana* estimulado por *A. baldaniorum* participa el transporte simplástico de las auxinas

7. Objetivo general

Caracterizar la participación del transporte simplástico de las auxinas en la estimulación del desarrollo de las raíces laterales de *A. thaliana* por *A. baldaniorum*

7.1 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de *A. baldaniorum* (Sp245 y FAJ0009) sobre la modulación del sistema radicular en líneas de *A. thaliana* que restringen o aumentan el TS.
2. Analizar el nivel de auxinas, la deposición de callosa, el movimiento de un marcador químico en el sistema radicular de líneas de *A. thaliana* que restringen o aumentan el TS en presencia de *A. baldaniorum* Sp245.

3. Analizar el efecto del NPA en líneas de *A. thaliana* que restringen o aumentan el TS en presencia de *A. baldaniorum*.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Material vegetal

Las semillas utilizadas en esta investigación fueron Wt (Col-0), *DR5:GUS* (Ulmasov *et al.*, 1997), *pdlp5-1 DR5:GUS*, *PDLP5OE DR5:GUS* (Sager *et al.*, 2020), *pCRE1::icals3m* y *pCALS3::icals3m* de *A. thaliana* (Vatén *et al.*, 2011).

8.2 Desinfección, estratificación, siembra e incubación de las semillas de *Arabidopsis thaliana*

Las semillas Wt, *DR5:GUS*, *pdlp5-1 DR5:GUS* y *PDLP5OE DR5:GUS* se trataron con una solución de cloro al 5 % y SDS al 1 % y estratificaron 48 h a 4 °C. Posteriormente, las semillas se sembraron en placas de Petri con medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) 05.X, sacarosa al 0.5%, agar al 0.8% y suplementado con 200 µL/L de una solución vitamínica (tiamina 1 mg/mL, piridoxina 5 mg/mL y ácido nicotínico 5 mg/mL). Las cajas se incubaron en posición vertical en una cámara de crecimiento vegetal con luz continua durante 5 días, para obtener las plántulas de 5 días de edad (dde).

8.3 Movilización del marcador *DR5:GUS* al fondo genético de *pCRE1::icals3m* y *pCALS3::icals3m*

Las semillas *DR5:GUS*, *pCRE1::icals3m* y *pCALS3::icals3m* se desinfectaron y estratificaron 48 h a 4 °C y se sembraron en medio MS 0.2X. El material se incubó por 15 días en una cámara de crecimiento con fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad. Las semillas que donaron el polen (*DR5:GUS*) se sembraron primero y una semana después las líneas receptoras *pCRE1::icals3m* y *pCALS3::icals3m*. Las plántulas de 15 dde fueron transferidas a suelo estéril y se incubaron en fotoperiodo hasta que alcanzaron la etapa reproductiva. Una vez que las plantas de las líneas *pCRE1::icals3m* y *pCALS3::icals3m* presentaron flores, algunas de ellas se eligieron para ser fertilizadas con el polen de *DR5:GUS*. Estas flores, para identificarlas se marcaron con un hilo y cuando maduraron las silicuas se obtuvieron las semillas de la Filial 1 (F1). Las semillas F1 se cosecharon, almacenaron, desinfectaron y sembraron en medio MS 0.2X para seleccionar las plántulas que presentaran el marcador

DR5:GUS y el fenotipo *DR5:GUS* de la donante. Las plántulas seleccionadas se transfirieron a suelo estéril, donde se incubaron hasta que alcanzaran la etapa reproductiva para obtener las semillas de la F2. Estas últimas, fueron sembradas en medio MS 0.2X, donde se seleccionaron las plantas fenotípicamente parecidas a las líneas *pCRE1::icals3m* y *pCALS3::icals3m* de las cuales se obtuvieron semillas correspondientes a la filial F3. En las plantas en F3 se determinó la expresión de *DR5:GUS* y los fenotipos característicos de *pCRE1::icals3m* y *pCALS3::icals3m*.

8.4 Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) (Phytotechnology Laboratories) se preparó disolviendo en agua destilada la cantidad de sales correspondientes a las concentraciones de 0.2X y 0.5X MS y 0.5% de sacarosa. Después de ajustar el pH a 5.7 con una solución de KOH 1M, se agregó 0.8% de agar. Al medio tibio previamente esterilizado a 121 °C por 20 min se añadió 200 µL/L de una solución de vitaminas.

8.5 Preparación del medio de cultivo para el mantenimiento de *Azospirillum baldaniorum*

Las bacterias *A. baldaniorum* Sp245 y FAJ0009 se mantuvieron a 4 °C en medio de cultivo LB-tetraciclina (peptona 10g/L, extracto de levadura 5g/L, NaCl 5 g/L, MgSO₄ 0.186 g/L, CaCl₂ 0.2775 g/L, agar 1g/L y tetraciclina 10 µM). Las bacterias fueron resembradas cada 10 días en cajas Petri suplementadas con medio LB-tetraciclina e incubadas toda la noche a 37 °C. Cuando las bacterias se utilizaron para adicionarlas al medio MS, se resembraron e incubaron 16 h a 37 °C, posteriormente de estos cultivos se tomaron azadas de bacterias que se resuspendieron en un mL de agua destilada estéril. La absorbancia de estas soluciones se midió a 600 nm y a partir de la relación 0.9 Abs equivale a 1X10⁸ UFC/mL se determinó la concentración de la solución stock. Después, se calculó el volumen requerido de las soluciones stock para obtener la concentración de 2.5X10⁵ UFC/mL de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 o FAJ0009 en los medios, los cuales se agregaron junto con la solución de vitaminas.

8.6 Detección del AIA bacteriano en plántulas de *A. thaliana*

Se utilizó la línea reportera *DR5:GUS* de *A. thaliana* para analizar la detección del AIA sintetizado por *A. baldaniorum*. Se colocaron cinco plántulas *DR5:GUS* de 5 dde en cada pozo donde se inocularon con 2.5×10^5 UFC/mL de *A. baldaniorum* Sp245 o de FAJ0009, solos o suplementados con $48.9 \mu\text{M}$ de L-Trp. Como controles positivos, se añadieron $1 \mu\text{M}$ de AIA disuelto en DMSO o L-Trp. Las cajas de microtítulo se incubaron 16 h luz/8 h de oscuridad, a 75 rpm, 22°C por 1 y 4 días (Mora *et al.*, 2023). Al finalizar los tiempos de interacción, se descartó el medio y las plántulas se trataron con una solución de X-Gluc.

8.7 Actividad histoquímica de *GUS*

Las plántulas *DR5:GUS*, *pdlp5-1 DR5:GUS* y *PDLP5OE DR5:GUS* de *A. thaliana* expuestas a *A. baldaniorum* se incubaron toda la noche a 37°C en una solución de X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido; Phytotechnology Laboratories®), 1 mM en un buffer de fosfatos (NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 0.1 M), pH = 7, añadiendo 2 mM de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ y $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Jefferson *et al.*, 1987). Posteriormente, las plántulas fueron aclaradas de acuerdo al siguiente protocolo: el material vegetal se incubó en una solución ácida (HCl 0.24 N y metanol al 20%) por 80 min a 60°C . Posteriormente, se transfirieron e incubaron en una solución de NaOH al 7% y etanol (EtOH) al 60% por 40 min a temperatura ambiente. Después, las plántulas se rehidrataron en soluciones de EtOH al 40 %, 20 % y 10 % por 15 min (Malamy y Benfey, 1997) e incubaron durante la noche en una solución de glicerol al 50 %. Finalmente, las plántulas se montaron en portaobjetos y observaron al microscopio (Nikon, Optiphot-2, Japón) con un objetivo de 4X.

8.8 Movimiento del CFDA

Para evaluar la permeabilidad de los PD, las plántulas de ocho dde de *A. thaliana*, se expusieron a una solución 1 mM de diacetato de 5(6)-carboxifluoresceína (CFDA, Sigma) durante 30 minutos y se lavaron con agua. Posteriormente, las muestras se observaron al microscopio confocal (Olympus FV1200; Olympus Corp., Tokio, Japón) a $\lambda = 488 \text{ nm}$ de excitación y $\lambda = 505\text{-}545 \text{ nm}$ de emisión (Benítez-Alfonso *et al.*, 2013).

8.9 Tinción de la callosa

La deposición de callosa se detectó mediante el fluorocromo azul de anilina (Sigma). Para este procedimiento, se preparó una solución stock de anilina en buffer de fosfato de sodio 100 mM (pH = 7.2; 0.1 % p/v). Las plántulas de *DR5:GUS*, *pdlp5-1 DR5:GUS* y *PDLP5OE DR5:GUS* de ocho dde se incubaron en la solución de anilina por 1.5 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se observaron mediante un microscopio confocal (Olympus FV1200) a $\lambda = 405$ nm de excitación y $\lambda = 460\text{--}585$ nm de emisión (Müller *et al.*, 2015).

8.10 Evaluación de los parámetros de la arquitectura radicular de las plántulas de *A. thaliana*

El número de raíces laterales se determinó contando las RL presentes a lo largo de la raíz primaria utilizando un estereomicroscopio (Iroscope, ES-24, México). Para determinar el desarrollo de los primordios de las raíces laterales (PRL), se utilizaron plántulas *DR5:GUS* para facilitar su visualización y conteo de las diferentes etapas del desarrollo de dichas estructuras. Las diferentes etapas del desarrollo de los PRL se cuantificaron al primer día de interacción. Las plántulas *DR5:GUS* se incubaron durante la noche a 37 °C en una solución de X-Gluc. Después de este tratamiento se aclararon siguiendo el protocolo descrito en la sección 8.7. Cada PRL se clasificó de acuerdo con su etapa de desarrollo según lo reportado por Malamy y Benfey, 1997. Las etapas de desarrollo de los PRL indicadas con números romanos son las siguientes: I, iniciación de los PRL; II, dos capas celulares después de una división periclinal; III, la capa externa del primordio se divide periclinalmente, generando un primordio de tres capas; IV, PRL con cuatro capas celulares; V, el PRL está a la mitad del cortex de la RP; VI, el PRL ha atravesado el cortex y ha penetrado la epidermis. En la etapa VII, el PRL empieza a semejar a la punta de la RP y está a punto de emerger de la RP porque alcanza la capa de la epidermis.

8.11 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron mínimo tres veces de manera independiente evaluando 30 plántulas. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa STATISTICA 12.0 que

determina si los valores son estadísticamente representativos, se realizó un ANOVA con un valor de significancia de $p \leq 0.05$, posteriormente se realizó una prueba pos hoc de Tukey.

9. Resultados

9.1 *Azospirillum baldaniorum* Sp245 modifica la arquitectura del sistema radicular e induce cambios en la expresión de *DR5:GUS*

A. baldaniorum Sp245 induce cambios en el desarrollo del sistema radicular, particularmente en la formación de las RL en plántulas de *A. thaliana* crecidas en medio MS 0.2X e incubadas en fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad (Carrillo-Flores *et al.*, 2022). Ahora se determinó si el efecto antes mencionado podría alterarse si el material se sembraba en MS 0.5X e incubaba en luz continua. Para llevar a cabo esto, establecimos un sistema de interacción planta-bacteria *in vitro* utilizando *A. thaliana* Wt ecotipo Col-0. Después de 6 días de cointeracción, la bacteria arrestó el crecimiento de la RP e incrementó el desarrollo de las RL respecto al control sin inocular (Fig. 22). Estos resultados mostraron que la mayor concentración del medio MS y la incubación en luz continua no alteraron el efecto que *A. baldaniorum* induce sobre el sistema radicular de *A. thaliana*. Estos datos muestran que la bacteria induce la ramificación radicular y sugieren que *A. baldaniorum* Sp245 produce metabolitos que son percibidos por *A. thaliana* donde ejercen su actividad biológica modulando la señalización de auxinas.

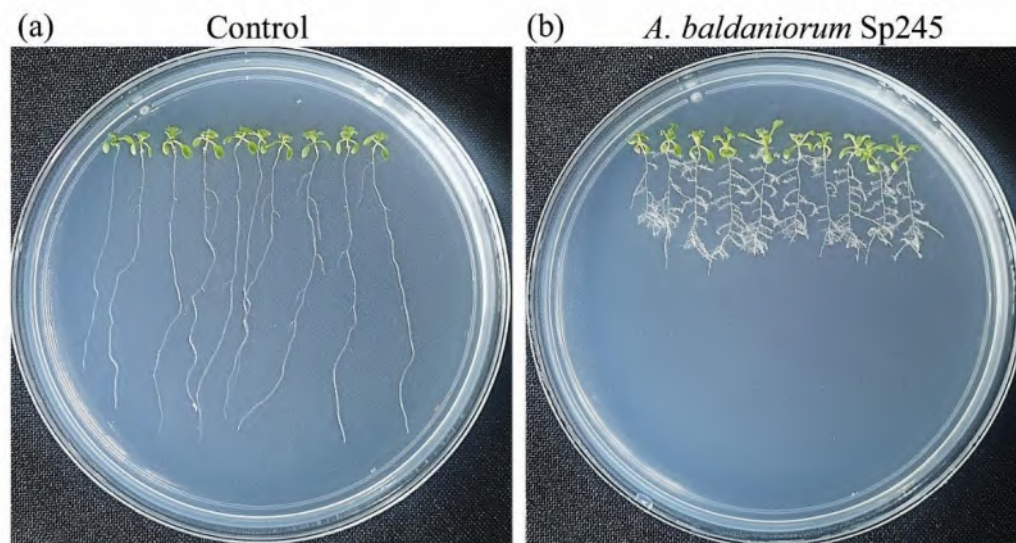


Figura 22. Efecto de *A. baldaniorum* Sp245 sobre el crecimiento de las plántulas de *A. thaliana*. Las plántulas de *A. thaliana* de cinco días de edad se transfirieron al medio control MS 0.5X o previamente inoculado con *A. baldaniorum* Sp245. **(a)** Fotografía de plántulas de 11 días de edad (Wt) crecidas en medio control. **(b)** Plántulas (Col-0) tratadas por 6 días con *A. baldaniorum* Sp245 y fotografiadas transcurrido este tiempo. El experimento se repitió tres veces con resultados similares.

Para confirmar esta hipótesis, se llevó a cabo el siguiente experimento: cinco plántulas *DR5:GUS* de cinco dde, se colocaron en pozos de una placa de macrotítulo, donde se añadió 1 ml de medio MS 0.2X sin e inoculado con *A. baldaniorum* Sp245 o FAJ0009. Como controles positivos, se usaron 1 μ M de AIA disuelto en DMSO o 48.9 μ M de L-Trp. Posteriormente, la caja se selló e incubó en fotoperiodo de 16 h luz/8 h de oscuridad a 75 rpm, 22 °C por 1 y 4 días. Después de 1d de interacción con *A. baldaniorum* Sp245, se observaron cambios en la expresión de *DR5:GUS* en la punta de la PR, respecto control (Fig. 23). Mientras que, el nivel de auxinas en presencia del L-Trp fue similar al control, en el experimento de cointeracción de *A. baldaniorum* Sp245 con *Arabidopsis* o suplementado con L-Trp, incrementó significativamente la expresión del marcador de auxinas a lo largo de la RP, desde la punta hasta la zona de diferenciación. Interessantemente, la mutante de *A. baldaniorum* FAJ0009 no indujo cambios en dicha expresión respecto al control, incluso ni en el medio suplementado con L-Trp. A los 4 días de cointeracción, una etapa de desarrollo más avanzada, se observó un efecto similar al descrito antes en los diferentes tratamientos. Sin embargo, *A. baldaniorum* Sp245, aunque indujo cambios en la expresión de *DR5:GUS*,

la señal se localizó principalmente en la zona de diferenciación (Figs. 23h-n). Este patrón nos llevó a plantear la hipótesis de que el movimiento de auxinas podría ser a través del TS.

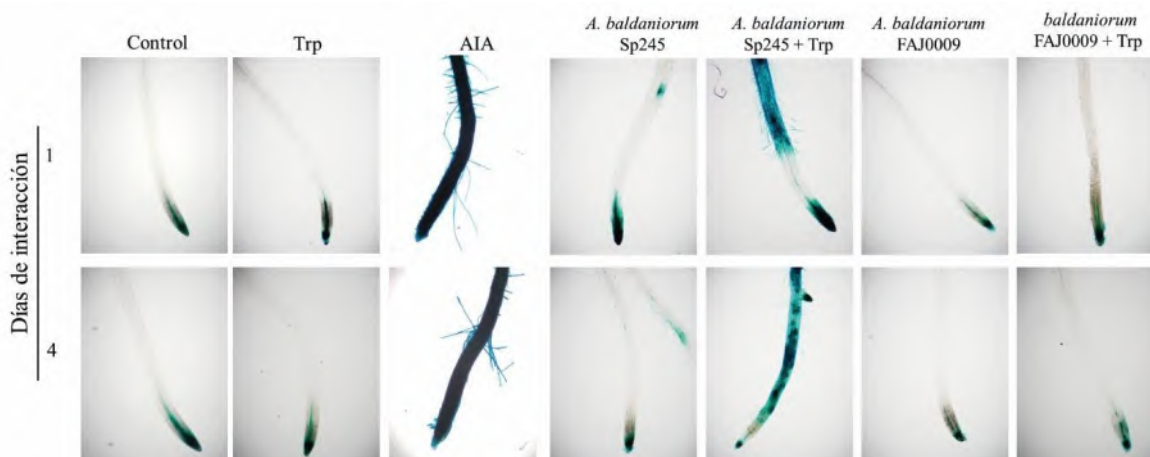


Figura 23. Efecto de *A. baldaniorum* sobre el nivel de auxinas (a-n) Tinción con *GUS* de la raíz primaria de plántulas *DR5:GUS* de *A. thaliana* crecidas por 5 días en medio sólido MS 0.2X. Posteriormente, las plántulas fueron transferidas a medio líquido control MS 0.2X o previamente inoculado con *A. baldaniorum* Sp245 o FAJ0009 donde se incubaron por 1 y 4 días. Para obtener controles positivos, las plántulas se expusieron el mismo tiempo a 48.9 μ M de L-Trp (**b e i**) o 1 μ M de IAA disuelto en DMSO (**c y j**). Al final del tiempo de incubación, las plántulas fueron tratadas con X-Gluc, seguido de un proceso de aclaramiento. Las plántulas se observaron con un estereomicroscopio con un objetivo de 4X. Las fotografías muestran las plántulas representativas de al menos 15 plántulas teñidas después de 1 y 4 días de interacción. El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

9.2 La inducción de raíces laterales en *A. thaliana* implica tanto la señalización de auxinas como el transporte simplástico

Para explorar la hipótesis de la participación del TS en los cambios del SR de *Arabidopsis*, llevamos a cabo experimentos de cointeracción entre las bacterias y plantas alteradas en el TS. Utilizamos *pdlp5-1 DR5:GUS* de *A. thaliana* que es una mutante que carece de una proteína que facilita la deposición de callosa sobre el cuello de los PD y la línea de sobreexpresión *PDLP5OE DR5:GUS*. En condiciones sin inocular o inoculadas con FAJ0009, las plántulas de *PDLP5OE DR5:GUS* mostraron una RP más corta con menos RL respecto a *DR5:GUS* y *pdlp5-1 DR5:GUS* (Figs. 24a- c, 24g-i). Mientras que, *A. baldaniorum* Sp245 en las tres líneas analizadas inhibió el crecimiento de RP y estimuló el desarrollo de las RL (Figs. 24d-f). Un marcado contraste respecto a la cepa *A. baldaniorum* FAJ0009 que no indujo cambios significativos del SR al comparar su efecto con el de *A. baldaniorum* Sp245 (Figs. 24a, b).

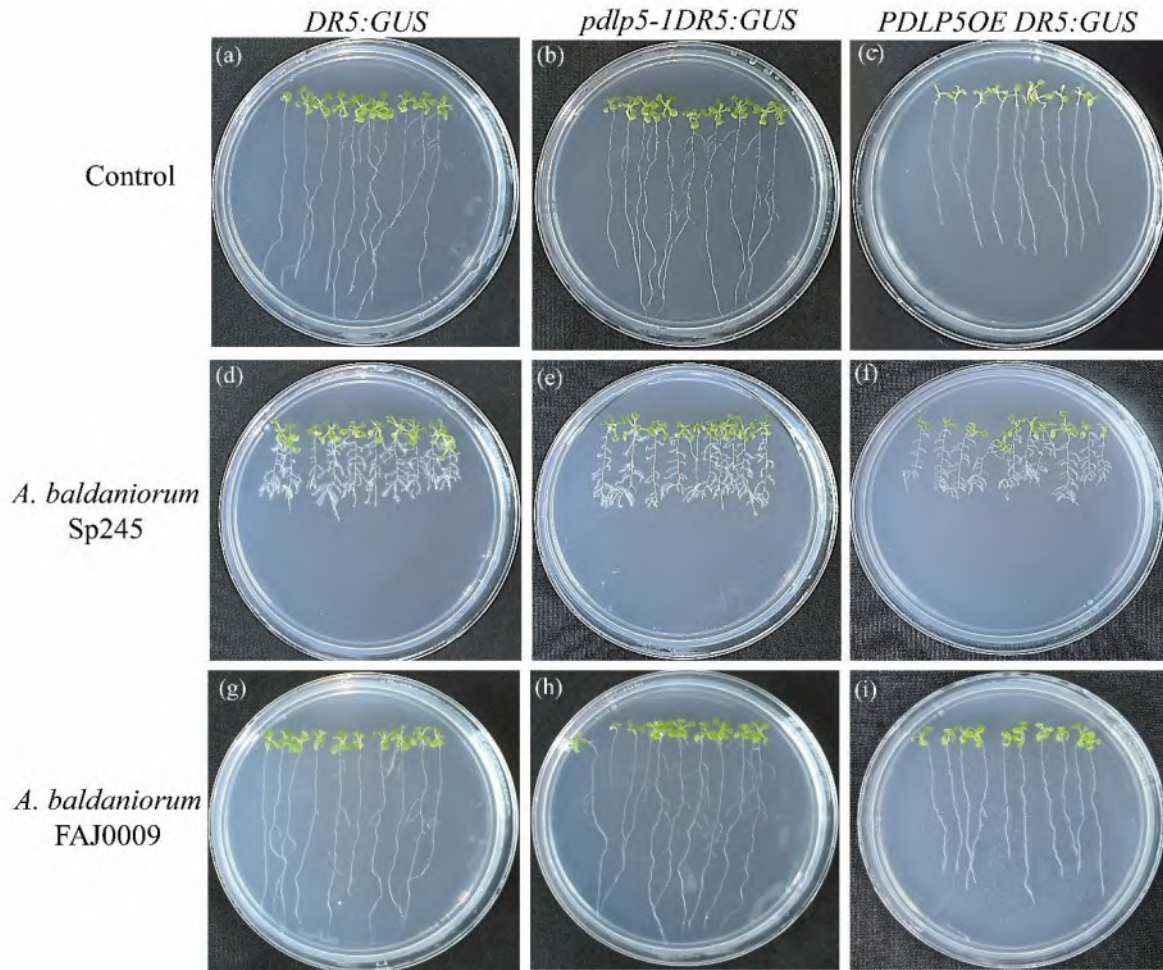


Figura 24. *A. baldaniorum* Sp245 para inducir el desarrollo de las raíces laterales de *A. thaliana* requiere parcialmente a PDLP5. (a-i) Las plántulas *DR5:GUS*, *pdlp5-1 DR5:GUS* y *PDLP5OE DR5:GUS* de *A. thaliana* fueron germinadas y crecidas por 5 días en medio MS 0.5X. Posteriormente, ellas se transfirieron a medios MS 0.5X sin la bacteria (control), suplementado con *A. baldaniorum* Sp245 o *A. baldaniorum* FAJ0009, donde se permitió su interacción por 6 días adicionales. El experimento se repitió tres veces con resultados similares.

Se observó en la línea *pdlp5-1 DR5:GUS* a los 3 días de interacción, un estímulo mayor del NRL en respuesta a *A. baldaniorum* Sp245 respecto a *DR5:GUS*, a diferencia de la inoculación con *A. baldaniorum* FAJ0009 que no indujo cambios en el SR (Fig. 25a). En el caso de la interacción de *PDLP5OE DR5:GUS* con *A. baldaniorum* Sp245, se observó que la bacteria no indujo la formación de las RL (Fig. 24e). Mientras que la inoculación con *A. baldaniorum* FAJ0009 en *PDLP5OE DR5:GUS* no cambio el SR (Fig. 25b).

Las RL emergen a partir de los primordios de las raíces laterales (PRL) que son estructuras compuestas por varias capas celulares que varían según su etapa de desarrollo (Fig. 25c).

Para determinar si *A. baldaniorum* Sp245 modula la formación de las RL a través de la formación de los PRL *de novo* o por acelerar su desarrollo, se contabilizó el número de PRL en *pdlp5-1 DR5:GUS*, *PDLP5OE DR5:GUS* y su respectivo control *DR5:GUS*. En plántulas *DR5:GUS*, la bacteria indujo tanto la formación como la maduración de los PRL, ya que se encontró un mayor número de estas estructuras en los estadios tempranos I-III y tardíos VI-VI, en comparación con los controles sin inocular (Fig. 25c). Se observó que *A. baldaniorum* Sp245 indujo un efecto similar al de *DR5:GUS* al interactuar con la las plántulas *pdlp5-1 DR5:GUS*, respecto a su control. Interesantemente, en la línea *PDLP5OE DR5:GUS*, la bacteria no indujo la formación de primordios en el estadio I, pero sí lo hizo en el resto de los estadios analizados (Fig. 25c).

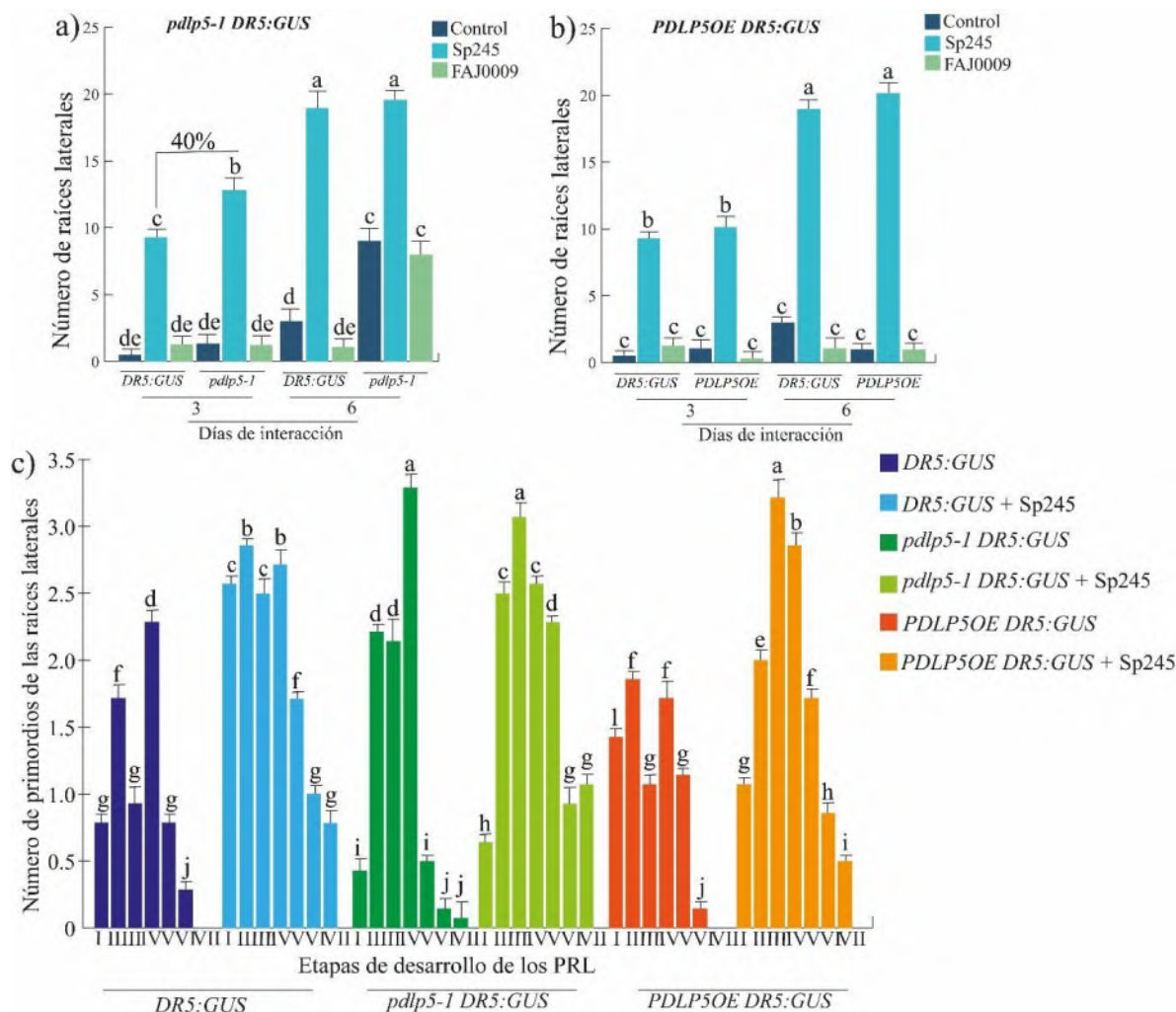


Figura 25. *A. baldaniorum* Sp245 regula el desarrollo de las raíces laterales de *A. thaliana* a través de PDLP5. Las plántulas de *A. thaliana* fueron germinadas y crecidas por cinco días en MS 0.5X y luego se transfirieron al mismo medio previamente inoculado con cada una de las cepas bacterianas, permitiendo su interacción por un período adicional de 3 o 6 días. **(a)** Número de raíces laterales de plántulas *DR5:GUS* y *pdlp5-1 DR5:GUS* en respuesta a *A. baldaniorum* Sp245 y FAJ0009. **(b)** Número de raíces laterales de plántulas *DR5:GUS* y *PDL5OE DR5:GUS* en respuesta a *A. baldaniorum* Sp245 y FAJ0009. **(c)** Efecto de *A. baldaniorum* Sp245 sobre las etapas de desarrollo de los primordios de las raíces laterales en plántulas *DR5:GUS*, *pdlp5-1 DR5:GUS* y *PDL5OE DR5:GUS* durante un día de interacción. Las barras de error representan los errores estándar (EE) del análisis de 15 plántulas teñidas con GUS. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas con un valor de $p \leq 0.05$. El experimento se repitió tres veces con resultados similares.

9.3 *A. baldaniorum* Sp245 modula diferencialmente la expresión de *DR5:GUS* en las líneas *pdlp5-1 DR5:GUS* y *PDL5OE DR5:GUS*

Como *A. baldaniorum* Sp245 induce el desarrollo de las RL y esto depende de las auxinas, para investigar si existe una posible interacción entre la vía de señalización mediada por auxinas y el TS del AIA, analizamos el efecto de *A. baldaniorum*: Sp245 y la mutante

FAJ0009 sobre el nivel de auxinas en las líneas *DR5:GUS*, *pdlp5-1 DR5:GUS* y *PDLP5OE DR5:GUS* a los 3 y 6 ddi. A los 3 ddi, *A. baldaniorum* Sp245 aumentó la expresión de *DR5:GUS* en las RL y en la zona de diferenciación celular de la RP, pero FAJ0009 no indujo estos efectos (Figs. 26a, d y g). Se observaron efectos similares a los de *DR5:GUS* en la línea *pdlp5-1 DR5:GUS* inoculada con ambas cepas bacterianas (Fig. 26b, e y h). Interesantemente, en la línea *PDLP5OE DR5:GUS*, se detectó una disminución en la expresión del marcador de auxina con *A. baldaniorum* Sp245 y ningún cambio en la expresión del marcador con FAJ0009 (Fig. 26c, f e i). Al analizar los mismos tratamientos después de 6 ddi, se observó un efecto sostenido en la expresión de *DR5:GUS* en *pdlp5-1 DR5:GUS* y *PDLP5OE DR5:GUS* con ambas cepas bacterianas, similar a la expresión observada a los 3 ddi (Fig. 26a'-i').

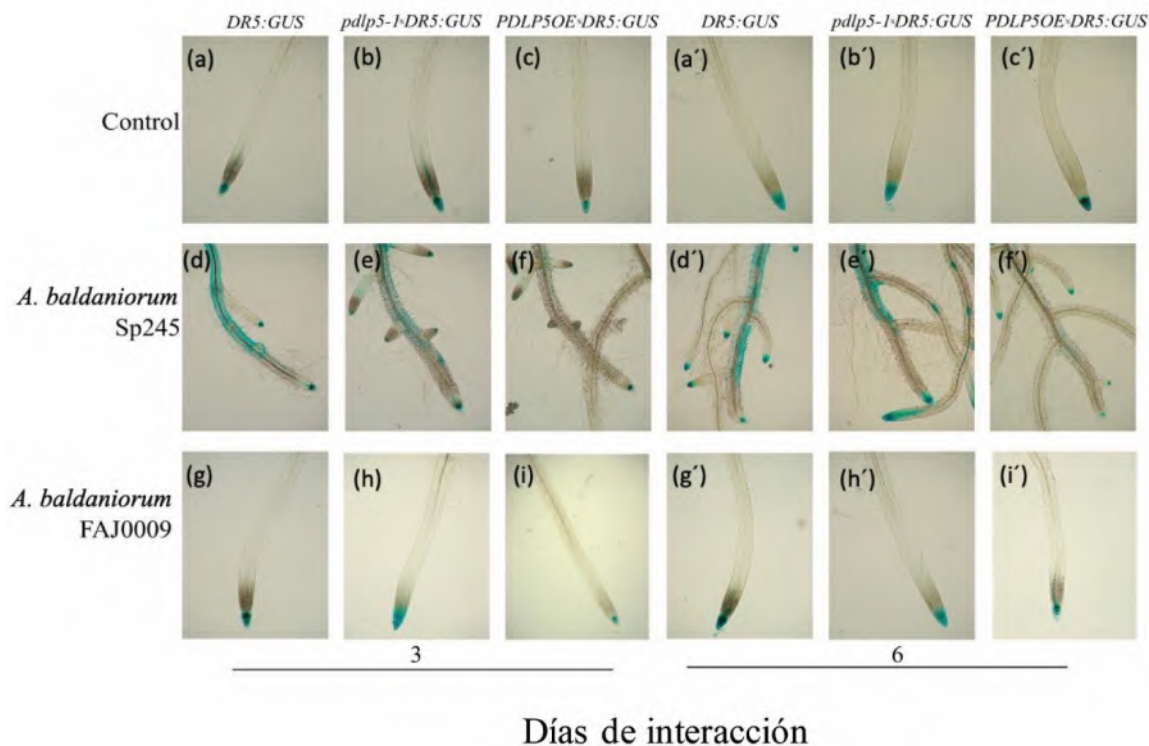


Figura 26. *A. baldaniorum* modula la expresión del marcador auxina a través de PDLP5. Se muestra la actividad de la β -glucuronidasa (*GUS*) en las plántulas de *A. thaliana* crecidas por tres (a-i) y seis (a'-i') días en interacción con la bacteria. Al finalizar el periodo de incubación, las plántulas fueron tratadas con X-Gluc, seguido de un proceso de aclarado. Las plántulas se observaron en un estereomicroscopio con un objetivo de 4X. Se muestran individuos representativos de 15 plántulas teñidas. El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

Para determinar si la inducción de las RL mediada por las auxinas producidas por *A. baldaniorum* Sp245 implica al TS, realizamos un experimento con 1 μ M de NPA, un inhibidor del PAT que afecta la formación de las RL. Como era de esperar, el NPA redujo drásticamente la formación de las RL. Cabe destacar que el inhibidor del PAT redujo 60% la formación de las RL inducida por la rizobacteria, en comparación con el tratamiento bacteriano sin NPA (Fig. 27). Se observó un efecto similar al de *DR5:GUS* en la interacción de *A. baldaniorum* Sp245 sobre *pdlp5-1 DR5:GUS*. Interesantemente, en el caso de *PDLP5OE DR5:GUS*, la bacteria indujo la formación de las RL. Sin embargo, el NPA solo disminuyó 30% la inducción de las RL. El experimento observado, después de 6 días de interacción presento una tendencia similar al de 3 días (Fig. 27).

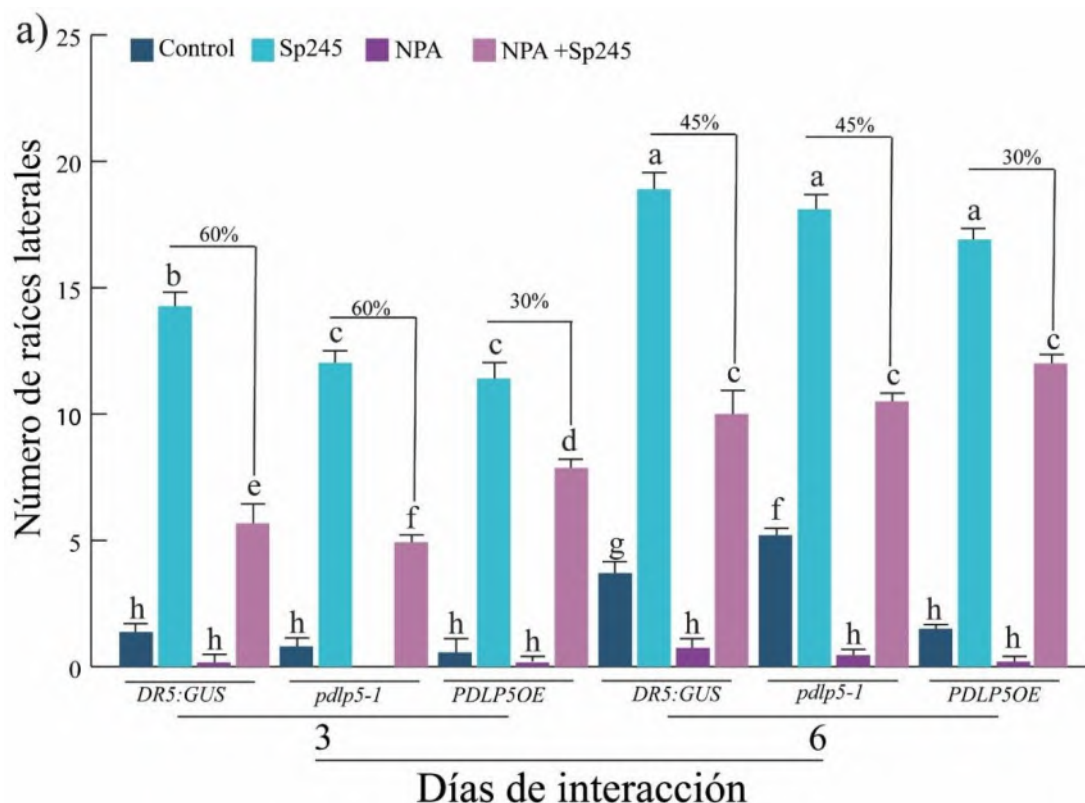


Figura 27. Efectos del NPA sobre la promoción del desarrollo de las raíces laterales en *A. thaliana* por *A. baldaniorum* Sp245. Plántulas de cinco días de edad fueron transferidas a medio 0.5X MS con y sin 1 μ M de NPA y con y sin 2.5×10^5 UFC/mL de la cepa bacteriana Sp245, además de la adición de 1 μ M de NPA. En estas condiciones, se permitieron interacciones entre la rizobacteria y las plántulas por 3 y 6 días. Los histogramas muestran el promedio de 25 plántulas $\pm$ SE. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos después las pruebas ANOVA y HSD post hoc ($p \leq 0.05$). El experimento se repitió tres veces con resultados similares.

9.4 El transporte simplástico y la acumulación de callosa están modulados por *A. baldaniorum* Sp245 en el sistema radicular de *A. thaliana*

Para evaluar la comunicación intracelular de los PD, las plántulas *DR5:GUS*, *pdlp5-1* *DR5:GUS*, *PDL5OE* *DR5:GUS* y *DR5:GUS* se expusieron al fluoróforo CFDA. Esta molécula al ser escindida por esterasas libera un compuesto fluorescente, el cual atraviesa los PD y se acumula en el ápice radicular. En este experimento, se detectó una menor fluorescencia en *PDL5OE* *DR5:GUS* y mayor en *pdlp5-1* *DR5:GUS* respecto al control *DR5:GUS* (Figs. 28a-c). Estos resultados eran los esperados, *PDL5OE* *DR5:GUS* con PD cerrados impide el movimiento del CFDA, mientras que en *pdlp5-1* *DR5:GUS* es mayor el movimiento del fluoróforo por la apertura de los PD.

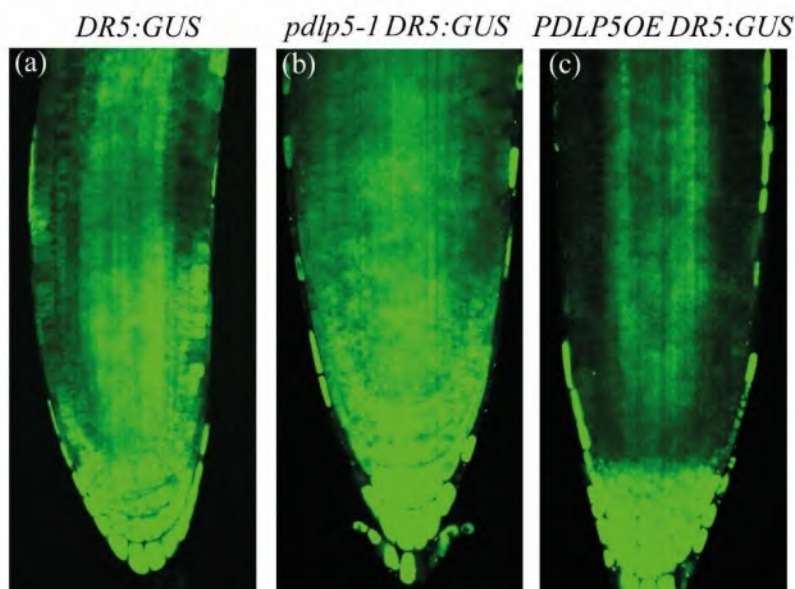


Figura 28. *PDL5OE DR5:GUS* reduce la permeabilidad de los plasmodesmos en *A. thaliana*. (a-c) Se analizó el transporte simplástico para medir la difusión, acumulación y fluorescencia del diacetato de 5-(6)-carboxifluoresceína (CFDA), 1 mM fue aplicado al follaje de las plántulas *DR5:GUS*, *pdlp5-1 DR5:GUS* y *PDL5OE DR5:GUS* de 6 días después de la germinación. 30 minutos después de la exposición al fluoróforo, las plántulas se colocaron en portaobjetos y observaron bajo un microscopio confocal a 40X de aumento. Se muestran individuos representativos de 15 plántulas teñidas. El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

Para determinar si la callosa participa en la modulación del transporte de CFDA, las plántulas *DR5:GUS*, *pdlp5-1 DR5:GUS* y *PDL5OE DR5:GUS* e inoculadas con *A. baldaniorum* Sp245 se trataron con azul de anilina para la detección de la callosa. Se observó una disminución de la intensidad de fluorescencia en *pdlp5-1 DR5:GUS* respecto a *PDL5OE DR5:GUS* y su control *DR5:GUS* (Figs. 29a-c), lo que indica variaciones significativas de callosa entre las tres líneas analizadas. Interesantemente, *A. baldaniorum* Sp245 indujo un aumento en la intensidad de fluorescencia de las líneas *pdlp5-1 DR5:GUS* y *DR5:GUS* en comparación con sus respectivos controles sin la bacteria (Fig. 29). En *PDL5OE DR5:GUS*, el tratamiento bacteriano alteró la distribución de la callosa en el ápice de la raíz primaria y se localizó el polímero predominantemente en la epidermis (Fig. 29f).

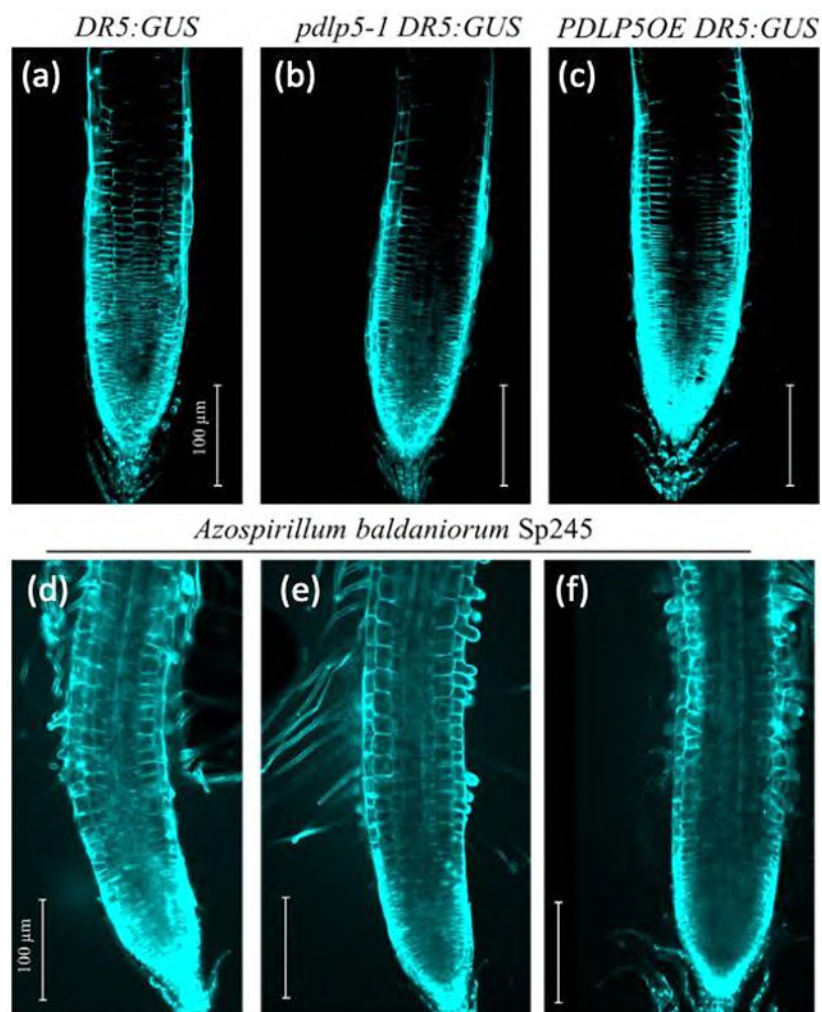


Figura 29. *A. baldaniorum* induce la deposición de callosa en la raíz de *A. thaliana*. El polímero fue detectado en plántulas de *DR5:GUS*, *pdlp5-1 DR5:GUS* y *PDLP5OE DR5:GUS* de 5 días de edad y 3 días de interacción con *A. baldaniorum* Sp245. Después de la aplicación de azul de anilina, las plántulas se montaron en portaobjetos y se observaron con un microscopio confocal 20X. Se muestran individuos representativos de 15 plántulas teñidas. El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

9.5 Participación de la sintasa de callosa 3 durante el desarrollo de las RL de *A. thaliana* inducidas por *A. baldaniorum* Sp245

El TS está regulado por la síntesis o degradación de la callosa, el primer proceso lo llevan a cabo las sintasas de callosa (CALS). En este trabajo se utilizaron las líneas dobles mutantes de ganancia de función en la síntesis de callosa condicionadas a estradiol (*icals3m*), bajo los promotores *pCRE1* (donde la apertura o cierre de los PD se lleva a cabo en el floema y xilema) y *pCALS3* (en el floema) (Váten *et al.*, 2011). Primero se analizó el efecto de *A. baldaniorum* Sp245 (barras azules) sobre el sistema radicular de *pCRE1::icals3m*, donde se

observó que a partir del tercer ddi un arresto del crecimiento de la RP y un estímulo del desarrollo de las RL, respecto al control (barras rojas) (Fig. 30a-b). Mientras que, cuando los PD están cerrados (presencia de estradiol) junto con la rizobacteria (barras amarillas) no se presentaron cambios respecto al efecto ocasionado por la apertura de los PD (barras azules). El único cambio que causó el cierre de los PD en presencia de *A. baldaniorum* fue una reducción del 40% en el crecimiento de las RL, respecto a cuando los PD están abiertos (barra azul vs barra amarilla).

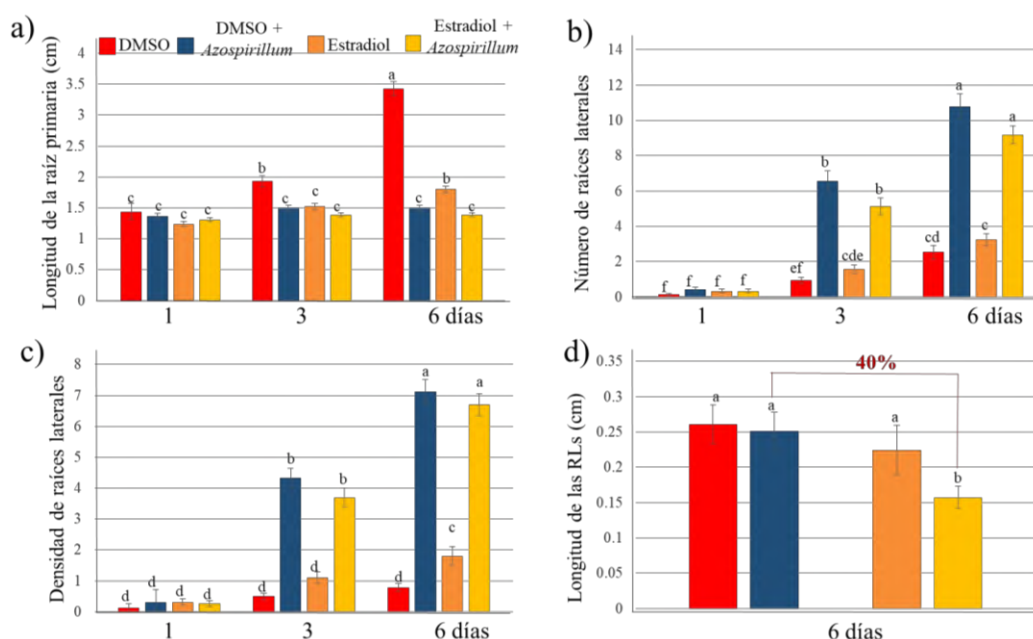


Figura 30. Efecto de *A. baldaniorum* Sp245 sobre la arquitectura radicular de *pCRE1::ical3m*. Las plántulas *pCRE1::ical3m* de 5 dde se transfirieron a medios de cultivo MS 0.2X control y suplementados con 2.5×10^5 UFC/mL de *A. brasilense*, se adicionó a ambos medios 10 μ M de estradiol y se incubaron durante 1, 3 y 6 días. **a)** Longitud de la raíz primaria. **b)** Número de raíces laterales. **c)** Densidad de las raíces laterales. **d)** Longitud de las raíces laterales de plántulas expuestas 6 días a *A. brasilense*. Los valores representan el promedio de 30 plántulas $\pm$ error estándar. Las letras indican las diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros de la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). El experimento se repitió tres veces con resultados similares.

Como uno de nuestros objetivos consistía en analizar el nivel de auxinas en plántulas de *A. thaliana* inoculadas con *A. baldaniorum* Sp245, en el fondo genético *pCRE1::ical3m* y *pCALS3::ical3m* se movilizó el marcador de auxinas *DR5::GUS*. En la filial F3 de *pCRE1::ical3m* lo primero que se determinó fueron los parámetros de la arquitectura radicular de las plántulas inoculadas con la rizobacteria. Se muestra que *A. baldaniorum* (barras azules) a partir del tercer ddi arresto el crecimiento de la RP (31a) y estimulo el

desarrollo de las RL, respecto al control (barras rojas) (Fig. 31b). El cierre de los PD en presencia de *Azopirillum* no causó cambios respecto al efecto ocasionado por la rizobacteria cuando los PD están abiertos (barras azules). El único cambio que indujo el cierre de los PD fue 22% de disminución del crecimiento de las RL, respecto a la apertura de los PD (barra azul vs barra amarilla) (Fig. 31d). Mientras que el marcador de auxinas se localizó en la punta de la RP con una ligera disminución cuando los PD están cerrados (Fig. 31e). Estos resultados muestran que la movilización del marcador *DR5::GUS* al fondo genético de *pCRE1::icals3m* no causó cambios sobre el sistema radicular inducido por *A. baldaniorum* Sp245.

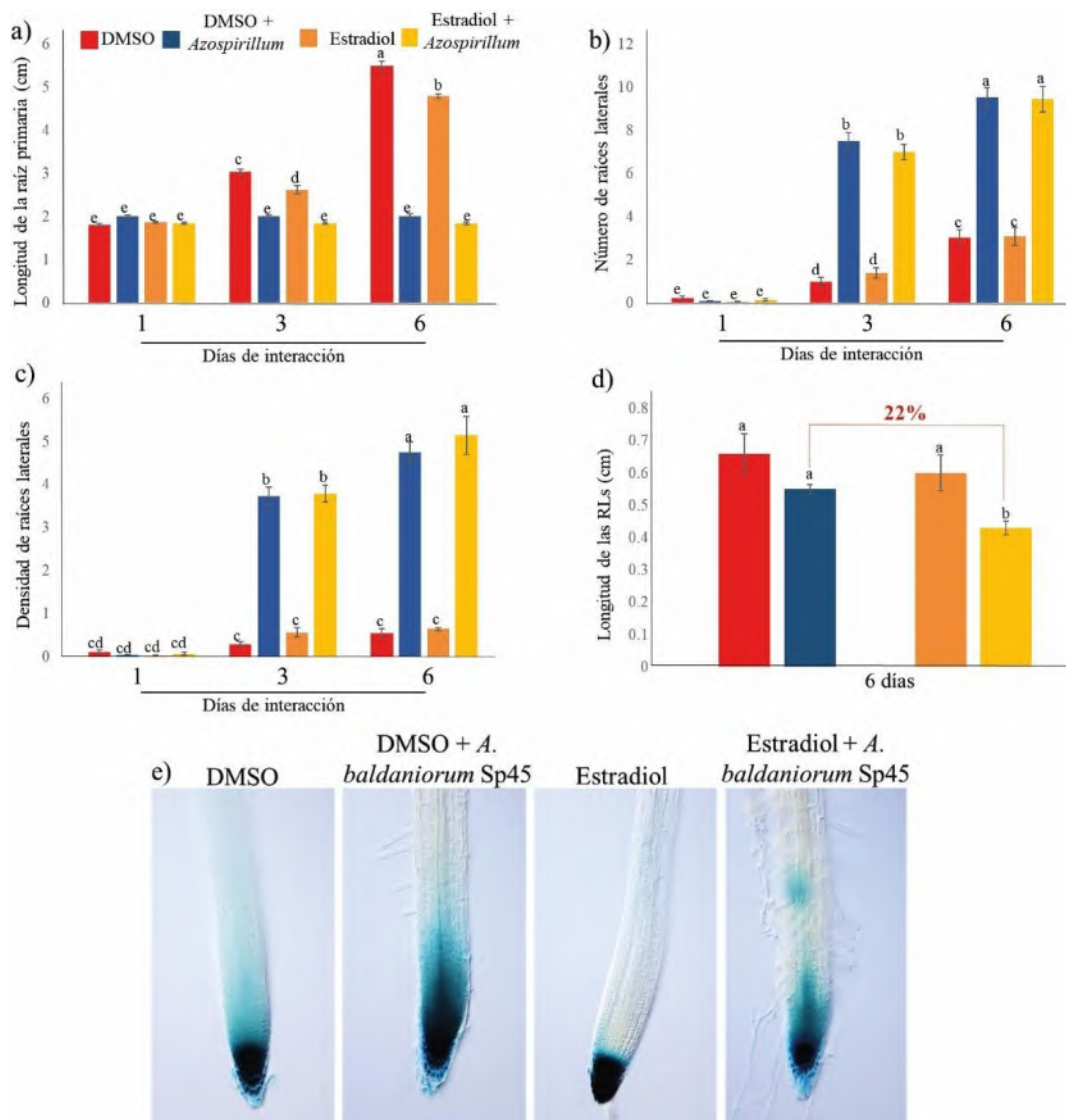


Figura 31. Efecto de *A. baldaniorum* sobre la arquitectura radicular y el nivel de auxinas de *pCRE1::icals3m DR5::GUS*. Las plántulas *pCRE1::icals3m DR5::GUS* de 5 dde se transfirieron a medios de cultivo MS 0.2X control y suplementados con 2.5×10^5 UFC/mL de *A. brasilense*, se adicionó a ambos medios 10 μ M de estradiol y se incubaron durante 1, 3 y 6 días. **a)** Longitud de la raíz primaria. **b)** Número de raíces laterales. **c)** Densidad de las raíces laterales. **d)** Longitud de las raíces laterales de plántulas expuestas 6 días a *A. brasilense*. **e)** Nivel de auxinas en la punta de raíz primaria de plántulas expuestas tres días a la rizobacteria. Los valores representan el promedio de 30 plántulas $\pm$ error estándar. Las letras indican las diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros de la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). El experimento se repitió tres veces con resultados similares.

9.6 Efecto de *A. baldaniorum* sobre la arquitectura radicular de *pCALS3::icals3m*

Posteriormente, se analizó el efecto de *A. baldaniorum* Sp245 sobre los parámetros del sistema radicular de *pCALS3::icals3m*, cuyo cierre de los PD se lleva a cabo solamente en el

floema. *A. baldaniorum* (barras azules) arresto el crecimiento de la RP a partir del tercer ddi e incremento el número de las RL (Fig. 32a-b), respecto al control (barras rojas). Al tercer ddi, el cierre de los PD en presencia de la rizobacteria (barras amarillas) redujo 57% el número de las RL, mientras que a los 6 ddi disminuyó 33% el crecimiento de las RL, respecto al control (barras azules vs barras amarillas) (Fig. 32c-d).

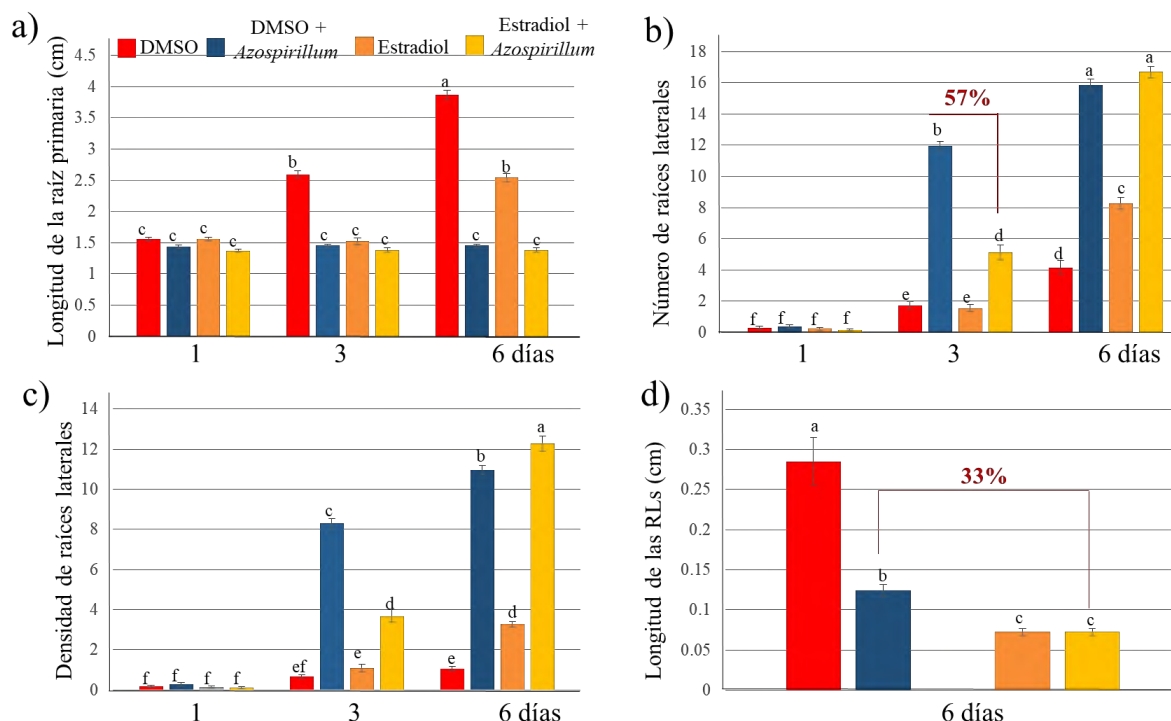


Figura 32. Efecto de *A. baldaniorum* Sp245 sobre la arquitectura radicular de *pCALS3::icals3m*. Las plántulas *pCALS3::icals3m* de 5 dde se transfirieron a medios de cultivo MS 0.2X control y suplementados con 2.5×10^5 UFC/mL de *A. brasilense*, se adiciono a ambos medios 10 μ M de estradiol y se incubaron durante 1, 3 y 6 días. **a)** Número de raíces laterales. **b)** Longitud de las raíces laterales de plántulas con 6 ddi con *A. brasilense*. **c)** Densidad de raíces laterales. **d)** Longitud de las raíces laterales. Los valores representan el promedio de 30 plántulas $\pm$ error estándar. Las letras indican las diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros de la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). El experimento se repitió tres veces con resultados similares.

Por otra parte, en las plántulas *pCASL3::icals3m DR5:GUS* en presencia de estradiol, *A. baldaniorum* Sp245 a los 3 ddi provocó 30% de disminución del NRL (Fig. 33a). Mientras que a los 6 ddi, cuando se cierran los PD, la bacteria ocasiono 43% de reducción en el crecimiento de las RL (Fig. 33d). Estos resultados muestran que el TS de las auxinas a través del floema modulan el desarrollo de las RL estimulado por *A. baldaniorum* a los 3 ddi (Fig. 33a y b). En la figura 33e, se muestra que las auxinas en la punta de la RP y en el haz vascular,

disminuyeron fuertemente cuando los PD se cierran (en presencia de estradiol). *Azospirillum baldaniorum* Sp245 ocasionó un aumento de auxinas cuando los PD están abiertos y su cierre provocó una fuerte disminución de auxinas en la punta de la PR y en el haz vascular.

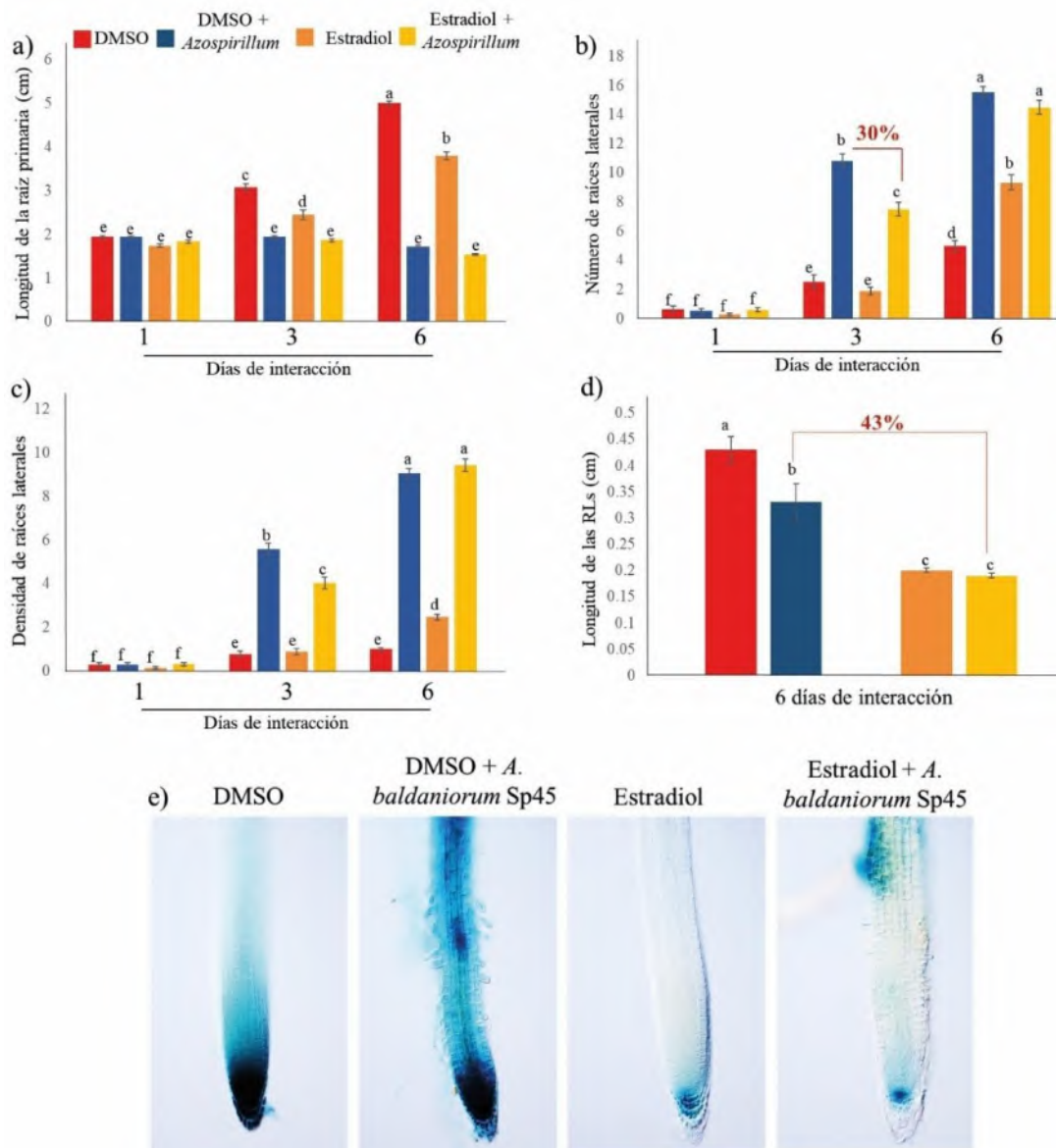


Figura 33. Efecto de *A. baldaniorum* Sp245 sobre la arquitectura radicular y el nivel de auxinas de *pCALS3::icals3m DR5:GUS*. Las *pCALS3::icals3m DR5:GUS* de 5 dde se transfirieron a medios de cultivo MS 0.2X control y suplementados con 2.5×10^5 UFC/mL de *A. baldaniorum* Sp245, se adicionó a ambos medios 10 μ M de estradiol y se incubaron durante 1, 3 y 6 días. **a)** Longitud de la raíz primaria. **b)** Número de raíces laterales. **c)** Densidad de las raíces laterales. **d)** Longitud de las raíces laterales de plántulas expuestas 6 días a *A. brasilense*. **e)** Nivel de auxinas en la punta de raíz primaria de plántulas expuestas tres días a la rizobacteria. Los valores representan el promedio de 30 plántulas $\pm$ error estándar. Las letras indican las diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros de la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). El experimento se repitió tres veces con resultados similares.

10. Discusión

En el suelo, existen comunidades complejas de microorganismos que, dentro de su nicho ecológico, pueden interactuar con las raíces de las plantas (Ortíz-Castro *et al.*, 2009). Esto puede ocurrir físicamente, mediante procesos de colonización o por el intercambio de compuestos de bajo peso molecular que difunden en el suelo y que son posteriormente percibidos por los organismos receptores, desencadenando respuestas bioquímicas, moleculares y fisiológicas (López-Bucio *et al.*, 2007; Gutiérrez-Luna *et al.*, 2010; Spaepen *et al.*, 2014; Contreras-Cornejo *et al.*, 2022). Por ejemplo, el hongo rizosférico *Trichoderma virens* produce $13.48 \pm 0.97 \mu\text{g/l}$ de AIA, suficiente para inducir el desarrollo de las RL de *A. thaliana* mediante un mecanismo molecular que involucra a AUX1, un transportador de influjo de las auxinas que participa en el movimiento acropetal y basipetal de las auxinas hacia la punta de la raíz (Swarup *et al.*, 2001; Contreras-Cornejo *et al.*, 2009).

Se sabe que *A. baldaniorum* Sp245 es una PGPR que induce cambios en el SR de varias especies de plantas (Spaepen *et al.*, 2009; Spaepen *et al.*, 2014; Licea-Herrera *et al.*, 2020; Carrillo-Flores *et al.*, 2022). Sin embargo, los factores moleculares implicados en la modulación de la plasticidad y la ramificación del SR siguen siendo en gran medida desconocidos. En este estudio, investigamos el efecto de la inoculación de *A. baldaniorum* Sp245 sobre elementos bioquímicos, moleculares y hormonales clave que regulan la inducción de las RL de *A. thaliana*.

Inicialmente, observamos que, después de 6 días de interacción, *A. baldaniorum* Sp245 indujo el acortamiento de la PR y la formación de RL. Este efecto ya había sido descrito previamente (Spaepen *et al.*, 2014; Méndez-Gómez *et al.*, 2021; Carrillo-Flores *et al.*, 2022), pero en esta investigación usamos condiciones diferentes de crecimiento a las habituales como son: MS 0.5X e incubación en luz continua. En estas condiciones el sistema radicular de *A. thaliana* mostro un fenotipo similar al antes mencionado lo que indica que las condiciones de interacción bacteria-planta en *in vitro* se establecieron correctamente para reproducir los datos comparativos con otros trabajos. La inducción de las RL es una respuesta fisiológica que resulta en la modulación de la señalización de auxinas (Roychoudhry y Kepinski, 2022).

Durante las interacciones planta-microorganismo, las auxinas son producidas por el microorganismo y posteriormente percibidas por las raíces. Los experimentos *in vitro* mostraron que *Arabidopsis* inoculada con *A. baldaniorum* y la presencia de un inhibidor de la enzima YUCA (implicada en la principal vía de biosíntesis de AIA en plantas), causaron un aumento en el desarrollo de las RL similar al inducido por *A. baldaniorum* (Carrillo-Flores *et al.*, 2022). Estos resultados sugieren que la estimulación del desarrollo de las RL por *A. baldaniorum* no implica la estimulación de la síntesis endógena del AIA en *Arabidopsis*. Las auxinas sintetizadas por los microorganismos desencadenan múltiples mecanismos de señalización que involucran la participación de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK6) y la expresión de genes relacionados con la división celular y la elongación, cuya expresión se evidencia por cambios en el fenotipo radicular (Contreras-Cornejo *et al.*, 2015; Carrillo-Flores *et al.*, 2022).

En este contexto, para determinar si la inducción de las RL de *A. thaliana* Wt (Col-0) causada por *A. baldaniorum* Sp245 involucra la señalización de auxinas, se analizó la expresión del reportero *DR5:GUS*, un gen sensible al AIA. Después de 1 día de interacción, se encontró que la bacteria aumentó la expresión de este gen. Interesantemente, la expresión de *DR5:GUS* aumentó drásticamente en la zona de diferenciación de la RP después de la aplicación de L-Trp al medio (Fig. 26), lo que sugiere que en la interacción con las plantas, las bacterias producen AIA a partir de este aminoácido. Una gran cantidad de reportes indican que el 82% de las bacterias son capaces de sintetizar AIA a partir de L-Trp secretado por las plantas y que las vías de síntesis utilizadas por las PGPR son: IPA y triptamina (Zhang *et al.*, 2019; Noor *et al.*, 2023). En *A. baldaniorum*, la biosíntesis de AIA se produce a partir de L-Trp, convirtiendo este aminoácido en ácido indol-3-pirúvico y luego a través de la actividad de la indol-3-pirúvato descarboxilasa produce AIA (Ganusova *et al.*, 2025). En plantas, los siguientes compuestos se han identificado como intermediarios en la biosíntesis de AIA: (i) indol-3-acetonitrilo, (ii) indol-3-acetamida, (iii) ácido indol-3-pirúvico y (iv) triptamina (Woodward y Bartel, 2005). La mutante FAJ0009 de *A. baldaniorum*, que produce niveles muy bajos de IAA (90% menos que la cepa de tipo silvestre *A. baldaniorum* Sp245) (Spaepen *et al.*, 2007; Spaepen *et al.*, 2014). En la interacción de FAJ0009 con *DR5:GUS*, no se observaron cambios en la expresión de auxinas, incluso después de la suplementación con L-Trp (Spaepen *et al.*, 2014).

Los cambios en la expresión de *DR5:GUS* sugieren que el acortamiento de la PR y la emergencia de las RL modulados por la bacteria involucran al AIA como señal molecular durante la interacción bacteria-planta. Sin embargo, los efectos inducidos por el AIA puro en el SR difieren ligeramente del fenotipo inducido por la bacteria *per se*. Por ejemplo, el AIA induce acortamiento en la PR y una disminución en la formación de las LR, mientras que *A. baldaniorum* Sp245 induce acortamiento de la RP y aumenta la formación de LR. Esto sugiere que durante la interacción con *A. thaliana*, *A. baldaniorum* Sp245 podría estar sintetizando otras moléculas como el etileno (Carlew *et al.*, 2025), compuestos orgánicos volátiles (Méndez-Gómez *et al.*, 2021), flagelina (Mora *et al.*, 2023) y exopolisacáridos (Viruega-Góngora *et al.*, 2020), que convergen con la señalización de auxinas para modular la emergencia de las RL.

El desarrollo de las RL de *Arabidopsis thaliana* inducidos por *Azospirillum baldaniorum* depende del PAT (Carrillo-Flores *et al.*, 2022). Recientemente, se ha sugerido que tanto el PAT como el TS deberían considerarse en los procesos de desarrollo vegetal que involucran el transporte de auxinas (Mellor *et al.*, 2020). Por esta razón, se utilizaron las líneas *pdlp5-1 DR5:GUS* y *PDLP5OE DR5:GUS*, con un TS acelerado y restringido, respectivamente. Los fenotipos de las líneas mutantes y de sobreexpresión de PDLP5 son contrastantes: *pdlp5-1 DR5:GUS* mostró RL más largas, mientras que en *PDLP5OE DR5:GUS* las RL fueron escasas y pequeñas. El fenotipo radicular de *pdlp5-1 DR5:GUS* y *PDLP5OE DR5:GUS* es ocasionado por una aceleración y retraso en el desarrollo de los PRL, respectivamente (Sager *et al.*, 2020). El comportamiento antes mencionado lo observamos en nuestras condiciones experimentales (Fig. 25). Mientras que, Benitez-Alfonso y col. en 2013, reportaron que la sobreexpresión de *PDCB* en *A. thaliana* incrementa el desarrollo de las RL, debido a que disminuye la distancia entre los sitios de formación de los PRL.

Debido a que los PD forman parte de la comunicación intercelular y desempeñan una función crucial a lo largo del ciclo de vida de las plantas y como durante la interacción *Arabidopsis-A. baldaniorum* Sp245, el AIA es una molécula que debe transportarse entre las células, investigamos si el TS y la señalización de AIA participan en la inducción de las RL modulada por la rizobacteria.

La proteína PDLP5 localizada en los plasmodesmos de *A. thaliana* está compuesta por 299 aminoácidos y presenta una masa de 31 804 Da. La proteína es un factor involucrado en el TS porque modula el tráfico intercelular, pero su participación en las interacciones microorganismo-planta sigue siendo en gran medida desconocida (Bayer y Benítez-Alfonso, 2024). En este trabajo, realizamos experimentos de interacción entre *A. baldaniorum* Sp245 y *pdlp5-1 DR5:GUS*, afectada en la acumulación de callosa sobre el cuello de los PD y la línea *PDLP5OE DR5:GUS* que sobre acumula el polímero. Como era de esperar, *A. baldaniorum* Sp245 indujo un acortamiento de la longitud de la RP y un incremento en la ramificación de las RL, mientras que la mutante FAJ0009 no provocó cambios respecto al control *DR5:GUS* (Spaepen *et al.*, 2014).

Interesantemente, después de 3 días de interacción, *A. baldaniorum* Sp245 indujo 40% de aumento en la formación de las RL en *pdlp5-1 DR5:GUS*, respecto a *DR5:GUS*. Sin embargo, FAJ0009 no indujo la formación de RL en esta planta mutante (Fig. 25a). Además, en la línea *PDLP5OE DR5:GUS* no se observó un aumento en la ramificación de las RL (Fig. 25b), lo que sugiere que el transporte simplástico del AIA a través de PD contribuyó a la formación de las RL durante la interacción. Estudios detallados de las RL revelaron que *A. baldaniorum* Sp245 al liberar auxina, induce la formación *de novo* de los PRL y su posterior maduración (Fig. 25c), donde PDLP5 es necesaria para orquestar este efecto de forma controlada.

La modulación del transporte del AIA a través de los PD también puede inferirse por el análisis de la expresión de *DR5:GUS*, en *pdlp5-1 DR5:GUS*, la cual se expresa en la epidermis de la zona de diferenciación de las RL. Este hecho es relevante y muestra una conexión clara entre la señalización del AIA y la expresión de *PDLP5* que se produce entre las células de la epidérmicas y del córtex (Sager *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2024). En la interacción bacteria-planta, no se observaron cambios en el nivel de auxinas en *PDLP5OE DR5:GUS* inoculada con *A. baldaniorum* Sp245, ni en la línea *pdlp5-1 DR5:GUS* inoculada con la mutante FAJ0009 (Fig. 26). Estos resultados sugieren que *A. baldaniorum* Sp245 modula la formación de las RL mediante la producción del AIA y la participación del TS, a través de la proteína PDLP5. Para confirmar este hallazgo, se realizaron experimentos con las líneas mutantes y sobreexpresión de *PDLP5*, crecidas en presencia de NPA, un inhibidor del PAT, e inoculadas con *A. baldaniorum* Sp245.

Como era de esperar, en la línea *DR5:GUS*, el NPA redujo la formación de las RL respecto al control sin inocular y sin NPA. La rizobacteria incremento el NRL nueve veces y solo redujo 60% la ramificación de las RL en comparación con las plantas tratadas con el inhibidor y la bacteria. Interesantemente, se observó un efecto similar en la línea *PDLP5OE DR5:GUS*, aunque en menor proporción (30%), lo que sugiere que la formación de las RL en presencia del NPA y *A. baldaniorum* Sp245 se debe a la formación del máximo de auxinas después del secuestro del AIA, causado por el cierre de los PD, debido a la acumulación de callosa. Falta determinar si durante la interacción *A. thaliana*-*A. baldaniorum* el PAT y el TS funcionan en paralelo o presentan un efecto compensatorio (Li *et al.*, 2024).

Se investigó la apertura de los PD y el tráfico molecular en las líneas *pdlp5-1 DR5:GUS* y *PDLP5OE DR5:GUS* utilizando el diacetato de 5(6)-carboxifluoresceína (CFDA). El CFDA es una molécula que se desplaza rápidamente a través de los tejidos vivos (Rutschow *et al.*, 2011). Este experimento mostró claramente un mayor flujo y acumulación de la molécula fluorescente en la raíz de *pdlp5-1 DR5:GUS*, lo que indica que los PD estaba abiertos. Sin embargo, en la línea *PDLP5OE DR5:GUS*, el flujo de CFDA disminuyó en comparación con *DR5:GUS* debido al cierre de los PD. En este contexto, se detectó acumulación de callosa en las mismas líneas, revelando menor fluorescencia del polímero en *pdlp5-1 DR5:GUS* que en *PDLP5OE DR5:GUS*, lo que demuestra que, en estas líneas, la acumulación de callosa está directamente relacionada con la actividad de PDLP5 y la apertura de los PD.

Se sabe que los altos niveles de callosa tras su acumulación correlacionan con un menor tráfico intercelular a través de PD (Zavaliev *et al.*, 2011; De Storme y Geelen, 2014). Interesantemente, descubrimos que *A. baldaniorum* Sp245 indujo mayor acumulación de callosa en las líneas *DR5:GUS*, *pdlp5-1 DR5:GUS* y *PDLP5OE DR5:GUS* en comparación con sus respectivos controles. Esto indica que, durante la interacción bacteria-planta, *A. baldaniorum* Sp245 altero la acumulación de callosa y en consecuencia la apertura de los PD y el transporte del AIA en la raíz. *A. baldaniorum* es una PGPR, que durante los primeros días de interacción *A. thaliana* la percibe como un patógeno lo que causa un incremento en la síntesis y deposición de callosa sobre el cuello de los PD (Spaepen *et al.*, 2014).

Los datos recientes sobre la funcionalidad de los plasmodesmos derivados de efectos electrocinéticos en sistemas nanofluídicos, ha permitido proponer un modelo que ilustra que,

cuando existe un equilibrio iónico (cationes y aniones) en la solución acuosa que conecta dos sistemas (células), no hay flujo neto de iones entre ellas (célula a célula) dentro del sistema. Sin embargo, cuando se produce un desequilibrio iónico (por ejemplo, exceso de aniones) en uno de los dos componentes del sistema, esto promueve el transporte de dichos iones de un lado del sistema al otro, es decir, célula a célula para alcanzar el equilibrio (Peters *et al.*, 2021), lo que puede ocurrir en el caso del AIA. Sin embargo, cuando los plasmodesmos se bloquean por exceso de callosa, como en el caso de la línea *PDLP5OE DR5:GUS*, el flujo del AIA se ve afectado. No obstante, esta suposición debe investigarse en detalle.

El TS también se analizó con las líneas dobles mutantes de ganancia de función en la síntesis de callosa *icals3m* expresado bajo los promotores *pCRE1* (floema y xilema) y *pCALS3* (floema). Los resultados mostraron que la restricción del TS solo en el floema regula el desarrollo y crecimiento de las RL, así como el nivel de auxinas de *A. thaliana* al ser inoculada con *A. baldaniorum* (Fig. 32). Esto podría deberse a que las auxinas bacteriales quedan aisladas simplásticamente en el floema creando así máximos de auxinas en las células del periciclo que dan lugar a PRL. Sin embargo, falta determinar si la disminución de las RL a los 3 ddi es ocasionada por un retraso en el desarrollo de los PRL, porque Benitez-Alfonso y col. 2013, reportaron que la deposición de callosa sobre el cuello de los PD afecta la iniciación y la distribución de los PRL. Respecto al aislamiento simplástico en el haz vascular de la raíz primaria en las plántulas *pCRE1::icals3m DR5:GUS* no presentaron cambios en desarrollo de las RL y una ligera disminución del marcador de auxinas inducidas por *A. baldaniorum* Sp247 (Fig. 30).

11. Conclusión

Azospirillum baldaniorum Sp245 modula el desarrollo de las raíces laterales de *Arabidopsis* a través del transporte polar de auxinas y del transporte simplástico. Sin embargo, aún queda por dilucidar que otros componentes del transporte simplástico podrían participar en los cambios de la arquitectura de la raíz.

12. Bibliografía

- Adhikari P.B., Liu X. and Kasahara R.D. 2020. Mechanics of pollen tube elongation: a perspective. *Front. Plant Sci.* 11: 589712.
- Alexandre G., Gree S.E. and Zhulin I.B. 2000. Energy taxis is the dominant behavior in *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* 182: 6042-6048.
- Amari K., Boutant E., Hofmann C., Schmitt-Keichinger C., Fernandez-Calvino L., Didier P., Lerich A., Mutterer J., Thomas C.L., Hainlein M., Maule A.J. and Ritzenthaler C. 2010. A family of plasmodesmal proteins with receptor-like properties for plant viral movement proteins. *PLoS Pathog.* 6: e1001119.
- Araujo A.S.F., Pereira A.P.A., de Madeiros E.V. and Mendes L.W. 2025. Root architecture and the rhizosphere microbiome: shaping sustainable agriculture. *Plant Sci.* 359: 112599.
- Arora K., Sharma S. and Monti A. 2016. Bio-remediation of Pb and Cd polluted soils by switchgrass: a case study in India. *Int. J. Phytoremediation* 18: 704-709.
- Aspinall G.O. and Kessler G. 1957. The structure of callose from the grape vine. *Chem. Industry* 1296.
- Assmus B., Hutzler P., Kirchhof G., Amann R., Lawrence J.R. and Hartmann A. 1995. In situ localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1013-1019.
- Bailly A., Sovero V., Vincenzetti V., Santelia D., Bartnik D., Koenig B.W., Mancuso S., Martinoia E. and Geisler M. 2008. Modulation of P-glycoproteins by auxin transport inhibitors is mediated by interaction with immunophilins. *J. Biol. Chem.* 283: 21817-21826.
- Banda J., Bellande K., von Wangenheim D., Goh T., Guyomarc'h S., Laplace L. and Bennett J.M. 2019. Lateral root formation in *Arabidopsis*: A well-ordered LRexit. *Trends Plant Sci.* 24: 826-839.

Barrada A., Montané M.H., Robaglia C. and Menand B. 2015. Spatial regulation of root growth: placing the plant TOR pathway in a developmental perspective. *Int. J. Mol. Sci.* 16: 19671-19697.

Bashan Y. and Levanov H. 1987. Horizontal and vertical movement of *Azospirillum brasilense* Cd in the soil and along the rhizosphere of wheat and weeds in controlled and field environments. *J. Gen Microbiol.* 133: 3473-3480.

Bashan Y. and de Bashan L.E. 2010. Chapter two-How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth-a critical assessment. *Adv. Agron.* 108: 77-136.

Bayer E.M. and Benitez-Alfonso Y. 2024. Plasmodesmata: Channels under pressure. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 75: 291-317.

Bayer E.M. and Benitez-Alfonso Y. 2024. Plasmodesmata: Channels under pressure. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 75: 291-317. DOI: 10.1146/annurev-arplant-070623-110093.

Beckers A., Mamita A., Furutani M., Bennett M.J., Fukaki H., Sawa S., Gantet P., Laplace L. and Guyomarc'h S. 2025. Multiple layers of regulators emerge in the network controlling lateral root organogenesis. *Trends Plant Sci.* 30: 499-514.

Benitez-Alfonso Y., Faulkner C., Pendle A., Miyashima S., Helariutta Y. and Mauler A. 2013. Symplastic intercellular connectivity regulates lateral root patterning. *Dev. Cell* 26: 135-147.

Brault M., Petite J.D., Immel F., Nicolas W.K., Glavier M., Brocard L., Gaston A., Fouché M., Hawkins T., Crowet J.-M., Grison M., Germain V., Rocher M., Kraner M., Alva V., Claverol S., Paterlini A., Helariutta Y., Deleu M., Lins L., Tilsner J. and Bayer E.M. 2019. Multiple C2 domains and transmembrane region proteins (MCTPs) tether membranes at plasmodesmata. *EMBO Rep.* 20: e47182.

Brumos J., Robles L.M., Yun J., Vu T.C., Jackson S., Alonso J.M. and Stepanova A.N. 2018. Local auxin biosynthesis is a key regulator of plant development. *Dev. Cell* 47: 306-318.e5.

Brunkard J.O. and Zambrysky P.C. 2017. Plasmodesmata enable multicellularity: new insights into their evolution, biogenesis, and functions in development and immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 35: 76-83.

Brunkard J.O., Runkel A.M. and Zambryski P.A. 2015. The cytosol must Flow: intercellular transport through plasmodesmata. *Curr. Opin. Cell Biol.* 35: 13-20.

Burbulis I.E., Lacobucci M. and Shirley B.W. 1996. A null mutation in the first enzyme of flavonoid biosynthesis does not affect male fertility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 6: 1013-1025.

Burch-Smith T.M. and Zambryski P.C. 2012. Plasmodesmata paradigm shift: regulation from without versus within. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63: 239-260.

Cao X., Yang H., Shang C., Ma S., Liu L. and Cheng J. 2019. The roles of auxin biosynthesis YUCCA gene family in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 20: 6343.

Carella P., Isaacs M. and Cameron K. 2014. Plasmodesmata-located protein overexpression negatively impacts the manifestation of systemic acquired resistance and the long-distance movement of defective in induced resistance1 in *Arabidopsis*. *Plant Biol.* 17: 395-401.

Carlew T.S., Brenya E., Ferdous M., Benerjee I., Donnelly L., Heinze E., King J., Sexton B., Lacey R.F., Bakshi A., Alexandre G. and Binder B.M. 2025. Ethylene signal through an ethylene receptor to modulate biofilm and root colonization in a beneficial plant-associated bacterium. *PLoS Genet.* 21: e1011587.

Carrillo-Flores E., Arreola-Rivera J., Pazos-Solís D.M., Bocanegra-Mondragón M., Fierros-Romero G., Mellado-Rojas M.E. and Beltrán-Peña E. 2022. Participation of auxin transport in the early response of the *Arabidopsis* root system to inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Phyton* 91: 2383-2401.

Casanova-Sáez R., Mateo-Bonmatí E. and Ljung K. 2021. Auxin metabolism in plants. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 13: a039867.

Cassán F., Coniglio A., López G., Molina R., Nievas S., Le Noir de Carlan C., Donadio F., Torres D., Rosas S., Olvera Pedrosa F., de Souza E., Díaz Zorita M., de-Bashan L. and Mora V. 2020. Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. *Biol. Fertil Soils* 56: 461-479.

Chamkhi I., El Omaric N., Balahbib A., El Menyiny N., Benali T. and Ghoulam C. 2021. Is the rhizosphere a source of applicable multi-benefical microorganisms for plant enhancement?. *Saudi J. Biol. Sci.* 29: 1426-1259.

Chen L. and Liu Y. 2024. The function of root exudates in the root colonization by beneficial soil rhizobacteria. *Biology* 13: 95.

Chepsergon J. and Moleleki L.N. 2023. Rhizosphere bacterial interactions and impact on plant health. *Curr. Opin. Microbiol.* 73: 102297.

Contreras-Cornejo H.A., López-Bucio J.S., Méndez-Bravo A., Macías-Rodríguez L., Ramos-Vega M., Guevara-García A.A. and López-Bucio J. 2015. Mitogen activated protein kinase 6 and ethylene and auxin signaling pathways are involved in *Arabidopsis* root system architecture alterations by *Trichoderma atroviride*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 28:701-710.

Contreras-Cornejo H.A., Macías-Rodríguez L., Cortés-Penagos C. and López-Bucio J. 2009. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 149:1579-1592.

Contreras-Cornejo H.A., Ramírez-Ordorica A., Álvarez-Navarrete M. and Macías-Rodríguez L. 2022. The role of phytohormones in cross-communication between plants and rhizo-microbes. In *Microbial Cross-talk in the Rhizosphere, Rhizosphere Biology*. Eds. B. A. Horwitz, P. K. Mukherjee. Springer Nature Singapore Pte Ltd. Pp. XXXX.

Crawford K.M. and Zambryski P.C. 2001. Non-targeted and targeted protein movement through plasmodesmata in leaves in different developmental and physiological states. *Plant Physiol.* 125: 1802-1812.

Cui X., Wang J., Li K., Lv B., Hou B. and Ding Z. 2023. Protein post-translational modifications in auxin signaling. *J. Gen. Genom.* 51.

De Rybel B., Vassileva V., Paritzot B., Demeulenaere M., Grunewald W., Audenaert D., Van Campenhout J., Overvoorde P., Jansen L., Vanneste S., Möller B., Wilson M., Holman T., Van Isterdael G., Brunoud G., Vuylsteke M., Vernoux T., De Veylder L., Inzé D., Weijers D., Bennett M.J. and Beeckman T. 2010. A novel aux/IAA28 signaling cascade activates GATA23-dependent specifications of lateral root founder cell identity. *Curr. Biol.* 20: 1697-1706.

De Storme N. and Geelen D. 2014. Callose homeostasis at plasmodesmata: molecular regulators and developmental relevance. *Front. Plant Sci.* 5:138.

Dharmasiri S., Swarup R., Mockaitis K., Dharmasiri N., Singh K.S., Kowalchuk M., Marchant A., Mills S., Sandberg G., Bennett J.M. and Estelle M. 2006. AXR4 is required for localization of the auxin influx facilitator AUX1. *Science* 312: 128-1220.

Díaz-Zorita M. and Fernández-Caniggia M.V. 2009. Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. *Eur. J. Soil. Biol.* 45: 3-11.

Díaz-Zorita M., Caniggia M.V.F., Bravo O.Á., Berger A. and Satorre E.H. 2015. Field evaluation of extensive crops inoculated with *Azospirillum* sp. In: Cassán F., Okon Y., Creus C. (eds) *Handbook for Azospirillum*. Springer, Cham.

dos Santos-Ferreira N., Hayashi San't 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. and 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.

Eljebbawi A., Rondón Guerrero Y. del C., Dunand C. and Estevez J.M. 2021. Highlighting reactive oxygen species as multitaskers in root development. *Science* 24: 101978.

Elortza F., Nühse T.S., Foster L.J., Stenballe A., Peck S.C. and Jensen O.N. 2003. Proteomic analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins. *Mol. Cell. Proteomics* 2: 1261-1270.

Faulkner C. and Bayer E.M.F. 2017. Isolation of plasmodesmata. *Methods Mol. Biol.* 1511: 187-198.

Faulkner C., Petutschning E., Benitez-Alfonso Y., Beck M., Robatzek S., Lipka V. and Maule A.J. 2013. LYM2-dependent chitin perception limits molecular flux via plasmodesmata. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110: 9166-9170.

Fedoreyeva L.I. and Kononenko N.V. 2025. Peptides and Reactive Oxygen Species regulates root development. *Int. J. Mol. Sci.* 26: 2995.

Fernandez-Calvino L., Faulkner C., Walshaw J., Saalbach G., Bayer E., Benitez-Alfonso Y. and Maule A. 2011. *Arabidopsis* plasmodesmal proteome. *PLoS One.* 6: e18880.

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

Ganusova E.E., Banerjee I., Seats T. and Alexandre G. 2025. Indole-3-acetic acid (IAA) protects *Azospirillum brasilense* from indole-induced stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 91: e0238424.

Gao C., Liu X., De Storme N., Jensen K.H., Xu Q., Yang J., Liu X., Che S., Martens H.J., Schulz A. and Liesche J. 2020. Directionality of plasmodesmata-mediated transport in *Arabidopsis* leaves support auxin channeling. *Curr. Biol.* 30: 1970-1977.e4.

Gong B.-Q., Wang F.-Z. and Li J.-F. 2020. Hide-and seek: chitin-triggered plant immunity and fungal counterstrategies. *Trends Plant Sci.* 25: 805-816.

Grison M.S., Brocard L., Fouillen L., Nicolas W., Wewer V., Dörmann P., Nacir H., Benitez-Alfonso Y., Claverol S., Germain V., Boutté Y., Mongrad S. and Mayer E.M. 2015. Specific membrane lipid composition is important for plasmodesmata function in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 27: 1228-1250.

Gusain P. and Bhandari B.S. 2019. Rhizosphere associated PGPR functioning. J. Pharmacogn. Phytochem. 8: 1181-1191.

Gutiérrez-Luna F.M., López-Bucio J., Altamirano-Hernández J., Valencia-Cantero E., Reyes de la Cruz H. and Macías-Rodríguez L. 2010. Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. Symbiosis 51:75–83.

Han H., Adamowski M., Qi L., Alotaibi S.S. and Friml J. 2021. PIN-mediated polar auxin transport regulations in plant tropic responses. New Phytol. 232: 510-522.

Han X., Huang L.-J., Feng D., Jiang W., Miu W. and Li N. 2019. Plasmodesmata-regulated structural and functional proteins: The long sought-after secrets of a cytoplasmic channel in plant cell walls. Int. J. Mol. Sci. 20: 2946.

Han X., Hyun T.K., Zhang M., Kumar R., Koh E.J., Kang B.H., Lucas W.J. and Kim J.Y. 2014. Auxin-callose-mediates plasmodesmal gating is essential for tropic auxin gradient formation and signaling. Dev. Cell 28: 132-146.

Hartmann M., Frey B., Mayer J., Mäder P. and Widmer F. 2015. Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional forming. ISME J. 9: 1177-1194.

Huang D., Sun Y., Ma Z., Ke M., Cui Y., Chen Z., Chen C., Ji C., Tran T.M., Yang L., Lam S.M., han Y., Shui G., Wei Z., Tan S., Liao K., Friml J., Miao Y., Jiang L. and Chen X. 2019. Salicylic acid-mediated plasmodesmal closure via remorine-dependent lipid organization. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 116: 21274-21284.

Jan M., Muhammad S., Jin W., Zhong W., Zhang S., Lin Y., Zhou Y., Liu J., Liu H., Munir R., Yue Q., Afzal M. and Wang G. 2024. Modulating root system architecture: cross-talk between auxin and phytohormones. Front. Plant Sci. 15: 1343928.

Jasinski S., Chardon F., Nesi N., Lécureuil A. and Guerche P. 2019. Improving seed oil and protein content in *Brassicaceae*: some new genetic insights from *Arabidopsis thaliana*. OCG. 25: 6.

Jefferson R.A., Kavanagh T.A. and Bevan M. 1987. GUS fusion: beta-glucoronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. 6: 3901-3907.

Kauss H. 1996. Síntesis de calosa. Membranas: funciones especializadas en plantas. Bios. Sci. Publ. 77-92.

Kazi N., Deaker R., Wilson N., Muhammad K. and Trethowa R. 2016. The response of wheat genotypes to inoculation with *Azospirillum brasilense* in the field. Field Crops Res. 196: 368-378.

Kuzyakov Y. and Razavi B.S. 2019. Rhizosphere size and shape: temporal dynamics and spatial stationarity. Soil Biol. Biochem. 135: 343-360.

Lee J.-Y., Wang X., Cui W., Sager R., Modla S., Czymbek K., Zybaliov B., van W K., Zhang C., Lu H. and Lakshmanan V. 2011. A plasmodesmata-localized protein mediates crosstalk between cell-to-cell communication and innate immunity in *Arabidopsis*. Plant Cell 23: 3353-3373.

Li J., Yang J., Gao Y., Zhang Z., Gao C., Chen S. and Liesche J. 2024. Parallel auxin transport via PINs and plasmodesmata during the *Arabidopsis* leaf hyponasty response. Plant Cell Rep. 43: 4.

Li N., Li Z., Yu P., Zeng Y., Du S. and Huang L.-J. 2023. The multifarious role of callose and callose synthase in plants development and environment interactions. Front. Plant Sci. 14: 1183402.

Li Z., Liu S.L., Montes-Serey C., Walley J.W. and Aung K. 2024. PLASMODESMATA-LOCATED PROTEIN 6 regulates plasmodesmal function in *Arabidopsis* vasculature. Plant Cell 36: 3543-3561.

Licea-Herrera J.I., Quiroz-Velásquez J.D.C. and Hernández-Mendoza J.L. 2020. Impact of *Azospirillum brasilense*, a rhizobacterium stimulating the production of indole-3-acetic acid as the mechanism of improving plant's growth in agricultural crops. Rev. Boliviana de Química.

- Liu J., Zhang L. and Yan D. 2021. Plasmodesmata-Involved battle against pathogens and potential strategies for strengthening host. *Front. Plant Sci.* 12: 644870.
- Liu N.-K., Zhang T., Liu S.-H., Chen X., Guo H.-S., Ju B.-H., Zhang Y.-Y., Li G.-Z., Zhou Q.-H., Qin Y.-M. and Zhu Y.-X. 2020. Phytosphinganine affects plasmodesmata permeability via facilitating PDL5-stimulated callose accumulation in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* 13: 128-143.
- López-Bucio J., Campos-Cuevas J.C., Hernández-Calderón E., Velásquez-Becerra C., Farías-Rodríguez R., Macías-Rodríguez L.I. and Valencia-Cantero E. 2007. *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin- and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20:207-17.
- López-Bucio J., Cruz-Ramírez A. and Herrera-Estrella L. 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 280-287.
- Luschnig C. and Friml J. 2024. Over 25 years of decrypting PIN-mediated plant development. *Nat. Commun.* 15: 9904.
- Malamy J.E. and Benfey P.N. 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124: 33-36.
- Masciarelli O., Llanes A. and Luna V. 2014. A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicus* enhance soybean nodulation. *Microbiol. Res.* 7: 609-615.
- Maule A.J., Gaudioso-Pedraza R. and Benitez-Alfonso Y. 2013. Callose deposition and symplastic connectivity are regulated prior to lateral root emergence. *Commun. Integr. Biol.* 6: e26531.
- Meisrimler C.-N., Allan C., Eccersall S. and Morris R.K. 2021. Interior design: how plant pathogens optimize their living conditions. *New Phytol.* 299: 2514-2524.
- Mellor L.N., Voß U., Janes G., Bennet J. M., Wells M.D. and Band R.L. 2020. Auxin fluxes through plasmodesmata modify root tip auxin distribution. *Development* 147: dev181669.

Méndez-Gómez M., Barrera-Ortiz S., Castro-Mercado E., López-Bucio J. and García-Pineda E. 2021. The nature of the interaction *Azospirillum-Arabidopsis* determines the molecular and morphological changes in root and plant growth promotion. *Protoplasma* 258: 179-189.

Mohamed R., Wang C.-T., Ma C., Shevchenko O., Dye S.J., Puzey J.R., Etherington E., Shen X., Melai R., Strauss S.H. and Brunner A.M. 2010. *Papulis* CEN/TFL1 regulates onset of flowering, axillary meristem identity and dormancy release in *Papulus*. *Plant J.* 62: 674-688.

Mora V., López G., Molina R., Coinglio A., Nievas S., De Diego N., Cávar Zeljković S., Salcedo sarmiento S., Spíchal L., Robertson S., Wilkins O., Elías J., Pedraza R., Estevez J.M., Belmonte M.F. and Cassán F. 2023. *Azospirillum argentinense* modifies *Arabidopsis* root architecture through auxin-dependent pathway and flagellin. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 23: 4543-4557.

Motte H., Vanneste S. and Beeckman T. 2019. Molecular and environmental regulation of root development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 70: 465-488.

Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

Muller J., Toev T., Heisters M., Teller J., Moore K., Hause G., Denish D.C., Bürstendinder K. and Abel S. 2015. Iron-dependent callose deposition adjusts root meristem maintenance to phosphate availability. *Dev. Cell* 33: 216-230.

Nie P., Li X., Wanh S., Guo J., Zhao H. and Niu D. 2017. Induced systemic resistance against *Botrytis cinerea* by *Bacillus cereus* AR156 through a JA/ET- and *NPR1*-dependent signaling pathway and activates PAMP-triggered immunity in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 8: 238.

Noor A., Ziaf K., Naveed M., Khan K.S., Ghani M.A., Ahmad I., Anwar R., Siddiqui M.H., Shakeel A. and Khan A.I. 2023. L-tryptophan-dependent auxin-producing plant-growth-promoting bacteria improve seed yield and quality of carrot by altering the umbel order. *Horticulturae* 9: 954.

Okon Y. and Labandera-Gonzalez C.A. 1994. Agronomic application of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 26: 1591-1601.

Okon Y., Labandera-Gonzales C., Lage M. and Lage P. 2015. Agronomic applications of *Azospirillum* and other PGPR. *Biol. Nitrogen Fix.* 2: 921-933.

Oluwaseyi S.O., Glick B.R. and Olubukola O.B. 2017. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Microbiol. Biotechnol.* 33: 197.

Oparka K.J., Roberts A.G., Boevink P., Santa Cruz S., Roberts I., Pradel K.S., Imlau A., Kotlizky G., Sauer N. and Epel B. 1999. Simple, but no branched, plasmodesmata allow the nonspecific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell* 97: 743-754.

Ortíz-Castro R., Contreras-Cornejo H.A., Macías-Rodríguez L. and López-Bucio J. 2009. The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal. Behav.* 4:701-712.

Pereg L., de-Bashan L.E. and Bashan Y. 2016. Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants. *Plant Soil* 299: 389-414.

Pérez-Sancho J., Smokvarska M., Dubois G., Glavier M., Sritharan S., Moraes T.S., Moureau H., Dietrich V., Platre M.P., Paterlini A., Li Z.P., Fouillen L., Grison M.S., Cana-Quijada P., Immel F., Wattelet V., Ducros M., Brocard L., Chambaud C., Luo Y., Ramakrishna P., Bayle V., Lefebvre-Legendre L., Claveron S., Zabradly M., Martin P.G.P., Busch W., Barberon M., Tilsner J., Helariutta Y., Russinova E., Taly A., Jaillais Y. and Mayer E.M. 2025. Plasmodesmata act as unconventional membrane contact sites regulating intercellular molecular exchange in plants. *Cell* 188: 958-977.

Peters W.S., Jensen K.H., Stone H.A. and Knoblauch M. 2021. Plasmodesmata and the problems with size: Interpreting the confusion. *J. Plant Physiol.* 257:153341.

Puente M.E., Holguin G., Glick B.R. and Bashan Y. 1999. Root-surface colonization of black mangrove seedlings by *Azospirillum halopraeferens* and *Azospirillum brasilense* in seawater. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29: 283-292.

Ren S., Rutto L. and Katuramu D. 2019. Melatonin acts synergistically with auxin to promote lateral root development through fine tuning auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. PLoS One 14: e0221687.

Rinne P.L.H., Welling A., Vahala J., Ripel L., Ruonala R., Kangasjärvi J. and van der Schoot C. 2011. Chilling of dormant buds hyper induce FLOWERING LOCUS T and recruits GA-inducible 1,3-glucanases to reopen signal conduits and release dormancy in *Populus*. Plant Cell 23: 130-146.

Robert H.S. and Friml J. 2009. Auxin and other signals on the move in plant. Nat. Chem. Biol. 5: 325-332.

Rolón-Cárdenas G.A., Arvizu-Gómez J.L., Soria-Guerra R.E., Pacheco-Aguilar J.R., Alatorre-Cabos F. and Hernández-Morales A. 2022. The role of auxin and auxin-production bacteria in the tolerance and accumulation of cadmium by plants. Environ. Geochem. Health 44: 3743-3764.

Roychoudhry S. and Kepinski S. 2022. Auxin in root development. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 14: a039933.

Ruiz Rosquete M., Barbez E. and Kleine-Vehn J. 2012. Cellular auxin homeostasis: Gatekeeping is housekeeping. Mol. Plant 5: 772-786.

Rutschow H.L., Baschin T.I. and Kramer E.M. 2011. Regulation of solute flux through plasmodesmata in the root meristem. Plant Physiol. 155:1817-1826.

Sabir I.A., Hu X., Khan I. and Qin Y. 2025. Regulatory mechanisms of bud dormancy: environmental, hormonal, and genetic perspectives. Int. J. Sci. 26: 2517.

Sager R., Wang X., Hill K., Yoo B. C., Caplan J., Nedo A., Tran T., Bennet M. J. and Lee J.Y. 2020. Auxin-dependent control of a plasmodesmal regulator creates a negative feedback loop modulating lateral root emergence. Nat. Commun. 11: 364.

Salmon M.S. and Bayer E.M.F. 2013. Dissecting plasmodesmata molecular composition by mass spectrometry-based proteomics. Front. Plant Sci. 3: 307.

- Santner A., Calderon-Villalobos L.I. and Estelle M. 2009. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat. Chem. Biol.* 5: 301-307.
- Schaller G.E., Bishopp A. and Kieber J.J. 2015. The yin-yang of hormones: Cytokinin and auxin interactions in plant development. *Plant Cell* 27: 44-63.
- Shi Y., Pan Y., Xiang Li., Zhu Z., Fu W., Hao G., Gen Z., Chen S., Li Y. and Han D. 2022. Assembly of rhizosphere microbial communities in *Artemisia annua*: recruitment of plant growth-promoting microorganisms and inter-kingdom interactions between bacteria and fungi. *Plant Soil* 470: 127-139.
- Simon-Plas F., Perraki A., Bayer E., Gerbeau-Pissot P. and Mongrand. 2011. An update on plant membrane rafts. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14: 642-649.
- Simpson C., Thomas C., Findlay K., Bayer E. and Maule A.J. 2009. An *Arabidopsis* GPI-anchor plasmodesmal neck protein with callose binding activity and potential to regulate cell-to-cell trafficking. *Plant Cell* 21:581-596.
- Spaepen S., Bossuyt S., Engelen K., Marchal K. and 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: 850-861.
- Spaepen S., Vanderleyden J. and Okon Y. 2009. Plant-promoting actions of rhizobacteria. *Adv. Bot. Res.* 51: 283-320.
- Svolacchia N., Salvi E. and Sabatini. 2020. *Arabidopsis* primary root growth: let it grow, can't hold it back anymore. *Curr. Opin. Plant Biol.* 57: 133-141.
- Swarup R. and Bhosale R. 2019. Developmental roles of AUXIN1/LAX auxin influx carriers in plants. *Front. Plant Sci.* 10: 1306.
- Swarup R., Friml J., Marchant A., Ljung K., Sandberg G., Palme K. and Bennett M. 2001. Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes Dev.* 15: 2648–2653.

Takubo E., Mokato K., Harai S., Aoi Y., Ge C., Dai X., Fukui K., Hayashi K., Zhao Y. and Kasahara H. 2020. Role of Arabidopsis INDOLE-3-ACETIC ACID CARBOXYL METHYLTRANSFERASE 1 in auxin metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 527: 1033-1038.

Tanaka H., Kitakura S., Rakosová H., Uemura T., Feraru M., De Ryche R., Robert S., Kakimoto T. and Friml J. 2013. Cell polarity and patterning by PIN trafficking through early endosomal compartments in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* 9: e1003540.

Tee E.E. and Faulkner C. 2024. Plasmodesmata and intercellular molecular traffic control. *New Phytol.* 243: 32-47.

Tee E.E., Johnston M.G., Papp D. and Faulkner C. 2023. A PDLN-NHL3 complex integrated plasmodesmal immune. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 120: e2216397120.

Thomas C., Bayer E.M., Ritzenthaler C., Fernandez-Calvino L. and Mauler A.J. 2008. Specific targeting of a plasmodesmal protein affecting cell-to-cell communication. *PLoS Biol.* 6: e7.

Tsukagoshi H., Busch W. and Benfey P.N. 2010. Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* 143: 606-616.

Tugarova A.V., Vetchinkina E.P., Loshchinina E.A., Shchelochkov A.G., Nikitina V.E. and Kamnev A.A. 2013. The ability of the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* to reduce selenium (IV) to selenium (0). *Microbiol.* 82: 352-355.

Ung K.L., Winkler M., Schulz L., Kolb M., Janacek D.P., Dedic E., Stokes D., Hammes U.Z. and Pederson B.P. 2022. Structures and mechanism of the plant PIN-FORMED auxin transporter. *Nature* 609: 605-610.

Vatén A., Dettmer J., Wu S., Stierhof Y.D., Miyashima S., Yada S.R., Roberts C.J., Campilho A., Bulone V., Lichtenberger R., Lehesranta S., Mähönen A.P., Kim J.E., Jokitalo E., Sauer N., Scheres B., Nakajima K., Carlsbecker A., Gallagher K.L. and Helariutta Y. 2011. Callose biosynthesis regulates symplastic trafficking during root development. *Dev. Cell* 21: 1144-1155.

Vicente-Hernández A., Salgado-Garciglia R., Valencia-Cantero E., Ramírez-Ordorica A., Hernández-García A., García-Juárez P. and Macías-Rodríguez L. 2019. *Bacillus methylotrophicus* M4-96 stimulates the growth of strawberry (*Fragaria x ananassa* “Aromas” plant in vitro and slows *Botrytis cinerea* infection by two different methods of interaction. J. Plant Growth Regul. 38: 765-777.

Viruega-Góngora V., Acatitla-Jácome I.S., Reyes-Carmona S.R., Baca B.E. and Ramírez-Mata A. 2020. Spatio-temporal formation of biofilms and extracellular matrix analysis in *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol. Lett. 367: fnaa037.

Wang X., Robles Luna G., Arighi C.N. and Lee J.-Y. 2020. An evolutionarily conserved motif is required for plasmodesmata-located protein 5 to regulate cell-to-cell movement. Commun. Biol. 3: 291.

Wang X., Sager R., Cui W., Zhang C., Lu H. and Lee J.-Y. 2013. Salicylic acid regulates plasmodesmata closure during innate immune responses in *Arabidopsis*. Plant Cell. 25: 2315-2329.

Wang X., Zhu P., Qu S., Shing P.K. and Wang W. 2017. Ectodomain of plasmodesmata-localized protein 5 in *Arabidopsis*: expression, purification, crystallization and crystallographic analysis. Acta Crystallogr. F. Struct. Biol. Commun. 73: 532-535.

Westfall C.S., Sherr A.M., Zubieta C., Alvarez S., Schraft E., Marcellin R., Ramirez L. and Jez J.M. 2016. *Arabidopsis thaliana* GH3.5 acyl acid amido synthetase mediates metabolic crosstalk in auxin and salicylic acid homeostasis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 113: 13922-13922.

Wilson Z.A. 2000. The *Arabidopsis*. A Practical Approach. Editorial Oxford University Press. 1-4.

Woodward A.M. and Bartel B. 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. Ann. Bot. 95: 707-735.

Xu Bo., Cheval C., Laohavisit A., Hocking B., Chiasson D., Olsson T.S.G., Shirasu K., Faulkner C. and Gilliam M. 2017. A calmodulin-like protein regulates plasmodesmal closure during bacterial immune responses. *New. Phytol.* 215: 77-84.

Yan J., Yu H., Li B., Fan A., Melkonian J., Wang X., Zhou T. and Hua H. 2019. Cell autonomous and non-autonomous functions of plant intracellular immune receptors in stomatal defense and apoplastic defense. *PLoS Pathog.* 15: e1008094.

Yuan M., Ngou B.P.M., Ding P. and Xin X.-G. 2021. PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 62: 102030.

Zaliev R., Ueki S., Citovsky V. and Epel B.L. 2011. Biology of callose (beta-1,3-glucan) turn over at plasmodesmata. *Protoplasma* 248:117:130.

Zambryski P. 2004. Cell-to cell transport of proteins and fluorescent tracers via plasmodesmata during plant development. *J. Cell Biol.* 164: 165-168.

Zhang P., Jin T., Sahu S.K., Xu J., Shi Q., Liu H. and Wang Y. 2019. The distribution of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid synthesis pathways in bacteria unraveled by large-scale genomics analysis. *Molecules* 24: 1411.

Zluhan-Martínez E., López-Ruiz A.A., García-Gómez M.L., García-Ponce B., de la Paz Sánchez M., Álvarez-Buylla E.R. and Garay-Arroyo A. 2021. Integrative roles of phytohormones on cell proliferation, elongation and differentiation in the *Arabidopsis thaliana* primary root. *Front. Plant Sci.* 12: 659155.

13. Anexos

13.1 Plasmodesmata role on plant development regulation



Plasmodesmata role on plant development regulation

Abstract

Plants are sessile organisms that depend on the root system that anchors them to the soil and it permitted to take water and nutrients. Root system development depends on natural auxin, indole-3-acetic acid. The auxin are transported in plants by the polar auxin transport (PAT) and the symplastic transport (ST) through of the plasmodesmata (PD). In the present work, the participation of the TS during the development of *A. thaliana* was analyzed.

Keywords: callose, plant development, plasmodesmata, polar auxin transport, symplastic transport

Volume 10 Issue 6 - 2023

Carrillo-Flores E, Mellado-Rojas Ma E, Beltrán-Peña E

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México

Correspondence: Beltrán-Peña E, Laboratorio de Transducción de Señales, Edificio B3, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, Morelia, 58030, México, Email: eb@uvm.mx

Received: November 10, 2023 | Published: November 24, 2023

Abbreviations: ABCB/PGP, ATP-Binding Cassette/P-Glycoprotein; AUX/IAA, Auxin/Indole-3-Acetic Acid; ARF, Auxin Response Factor; CALS/GSL, callose synthase/glucan synthase-like; GFP, Green Fluorescent Protein; GH3, *GRETCHEN HAGEN3*; IAA, Indol-3-Acetic Acid; IPA, Indole-3-Pyruvic Acid; LR, Lateral Root; LRP, Lateral Root Primordia; PAT, Polar Auxin Transport; PIN, PIN-FORMED efflux; PDL, Plasmodesmata-Located Protein; PD, Plasmodesmata; PDCB, PD-Callose Binding protein; PR, Primary Root; QC, Quiescent Center; RAM, Root Apical Meristem; SAUR, *Small Auxin-Upregulated RNA*; SEL, Size Exclusion Limit; SCN, Stem Cell Niche; SKP1, S-phase Kinase-associated Protein1; CUL1, CULLIN1; RBX1, ring box protein1; ST, Symplastic Transport; TAA, Tryptophan; TIR1, Transport Inhibitor Response1; Trp, Tryptophan

Introduction

The natural auxin, indole-3-acetic acid (IAA), which regulates practically all plant development processes, is synthesized in plant foliage and mobilized to sink tissues by two types of transport; a rapid through of phloem and another that is carried out cell-cell and it known as polar auxin transport necessary for the auxin gradients establishment.¹ Recently, it has been shown that auxin is also mobilized through channels called plasmodesmata, movement known as symplastic transport that complements at PAT.² Studies several indicate that plants close PD due to callose deposition that causes a restriction of ST of auxins, affecting stomata development, lateral roots and plants tropic responses, which this manuscript will review the ST importance in plant development.

Auxin response network

The word auxin comes from the Greek *auxein* which means "to grow" and was discovered by observing of coleoptile bending of *Phalaris canariensis* towards light. Years later, it was shown that this effect was due to auxin accumulation in area of tissue folding.³ It is now known that virtually all plant development is auxin regulated.⁴⁻⁶ The auxin response network comprises the following events: i) homeostasis, ii) transport and iii) perception and signaling⁶ which are described below. i) Homeostasis, maintains the internal balance of IAA, through multiple and dynamic adjustments in synthesis,

storage, catabolism and conjugation of IAA. In *Arabidopsis*, IAA biosynthesis from tryptophan (Trp) can be carried out by four different pathways.¹⁰⁻¹³ The pathway main involved at indole-3-pyruvic acid (IPA), where Trp is converted by trp aminotransferases (TAA) to IPA, which at the same time is transformed by flavin mono-oxygenases YUCCA (YUC) to IAA (Figure 1).¹⁴ ii) IAA is distributed in plant by two ways: one from the young leaf tissues where it is synthesized to sink tissues through the phloem and another through of PAT over short distances. The PAT requires influx carriers AUXIN1/LIKE-AUX1 (AUX1/LAX) and PIN-FORMED efflux (PIN) and ATP-Binding Cassette/P-glycoprotein (ABCB/PGP) (Figure 1).¹⁵ iii) In perception and signaling events, when auxin concentration is low, the response is inhibited by the repressors Auxin/Indole-3-Acetic Acid (AUX/IAA) that sequester at the Auxin Response Factor transcription factors (ARF) and thereby prevent the expression of auxin early response genes. While, at auxin high concentrations it is perceived by nuclear receptor Transport Inhibitor Response1 (TIR1) binding to SCF complex (S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN1 (SKP1), CULLIN1 (CUL1), RING BOX PROTEIN1 (RBX1) and a F-box ligase E3 of ubiquitin, this allows auxin to bind AUX/IAA to the complex SCF. When this happens, the AUX/IAA are marked by the E3 ubiquitin ligase and it degraded via proteasome, with the consequent release of the ARFs and genes expression: *Small Auxin-Upregulated RNA* (SAUR), *GRETCHEN HAGEN3* (GH3) and *AUX/IAA* (Figure 1).¹⁶⁻¹⁸ As articles numerous have shown PAT participation during the plant development^{19,20} and recently it has been reported that auxins, in addition to moving through the PAT, also diffuse through ST²¹⁻²⁴ whereby both processes are described below.

Polar auxin transport

In *Arabidopsis thaliana* the family of PIN efflux carriers consists of members eight. At primary root (PR) tip, auxins that arrive through the phloem are redistributed by PIN carriers different, creating what it an auxin maximum in the Root Apical Meristem (RAM), essential for the indeterminate growth of root. In Figure 2A we can observe that PIN1 participates in auxin movement through vascular bundle; PIN4 it concentrates in Quiescent Center (QC); PIN3 and PIN7 redistribute them in region of columella and PIN2 transports the auxins from lateral root cap to epidermis and the same carrier returns it through



13.2 Participación del transporte simplástico de las auxinas durante el desarrollo de las plantas



Participación del transporte simplástico de las auxinas durante el desarrollo de las plantas Symplastic transport participation of auxins during plant development

Elizabeth Carrillo-Flores, Asdrúbal Aguilera-Méndez, Ma. Elena Mollado-Rojas, Elda Beltrán-Peña*

RESUMEN

La apropiada organogénesis de las plantas, durante su ciclo de vida, propicia su desarrollo y la adaptación a diferentes condiciones ambientales. Diversas fitohormonas regulan el desarrollo vegetal, pero la auxina denominada ácido indol-3-acético (AIA) es una de las más importantes. El AIA se sintetiza en la parte aérea de la planta y se moviliza a los tejidos demandantes por un transporte rápido que utiliza el floema y por el transporte polar de auxinas (TPA). Recientemente, se ha demostrado que las auxinas también se movilizan mediante el transporte simplástico (TS) a través de los plasmodesmos (PD), cuya apertura o cierre está regulada respectivamente por la degradación o la deposición de la callosa. El objetivo del presente trabajo fue profundizar en los avances sobre la participación del transporte simplástico de las auxinas durante el desarrollo vegetal, así como la degradación o deposición de la callosa, en el cierre o apertura de los PD, para regular el desarrollo de algunos órganos de *Arabidopsis thaliana*. La intervención de las proteínas PDLF5 es determinante para la deposición de la callosa en los PD, lo que regula la distribución de la auxina e impacta en la formación radicular, especialmente en las raíces laterales. La participación del TS es importante para desarrollar la actividad de las auxinas, lo cual favorece la formación radicular, necesaria en la mejora de absorción de nutrientes de las plantas. Este conocimiento puede ser utilizado para mejorar las plantas de interés agro-nómico.

PALABRAS CLAVE:

auxinas, callosa, desarrollo vegetal, plasmodesmos, transporte simplástico.

ABSTRACT

The appropriate organogenesis of plants during their life cycle promotes their development and adaptation to different environmental conditions. Various phytohormones regulate plant development but auxin, called Indole-3-Acetic Acid (IAA), is one of the most important. IAA is synthesized in the aerial part of plant and is mobilized to the demanding tissues by a rapid transport using the phloem and by the polar auxin transport (PAT). Recently, it has been shown that auxins also are mobilized by a symplastic transport (ST) through plasmodesmata (PD), which opening or closing is regulated by the callose degradation or deposition respectively. The objective of the present work was to deepen the analysis on the participation of symplastic transport of auxins during plant development, as well in the callose degradation or deposition, in the closing or opening of the PD, that regulates the development of some organs of *Arabidopsis thaliana*. The intervention of PDLF5 proteins is decisive for the callose deposition in the PD, which regulates the auxin distribution and impacts root formation, especially at the lateral roots. The participation of TS is important to develop the auxin activity, which favors root formation, necessary for the improvement plant nutrient absorption. This knowledge can be used to improve development plants of agronomic interest.

KEYWORDS: auxins, callose, plant development, plasmodesmata, symplastic transport.

*Correspondencia: eldabelt@umich.mx/Fecha de recepción: 20 de septiembre de 2023/Fecha de aceptación: 24 de enero de 2024/Fecha de publicación: 30 de enero de 2024.

*Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Avenida Francisco J. Múgica s/n, Ciudad, Universidad, colonia Politécnico del Río, Morelia, Michoacán, México, C. P. 68030.

CienciaUAT | 06

ISSN 2007-7521. 10(2): 04-18 (Ene-Jun 2024)



<https://doi.org/10.29059/cienciauat.v10i2.1833>

13.3 The plant growth-promoting rhizobacteria *Azospirillum baldaniorum* Sp245 induced root branching through the participation of PLASMODESMATA-LOCATED PROTEIN 5 in *Arabidopsis thaliana*



The plant growth-promoting rhizobacteria *Azospirillum baldaniorum* Sp245 induces root branching through the participation of PLASMODESMATA-LOCATED PROTEIN 5 in *Arabidopsis thaliana*

Elizabeth Carrillo-Flores ^a, Ma Elena Mellado-Rojas ^a, Asdrúbal Aguilera-Mendez ^a, León Francisco Ruiz-Herrera ^a, Hexon Angel Contreras-Cornejo ^b, Elda Beltrán-Peña ^{a,*}

^a Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, C.P. 58100, Morelia, Michoacán, México
^b Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Morelia, S8120, Morelia, Michoacán, México

ARTICLE INFO

Keywords:
Auxin transport
Azospirillum baldaniorum Sp245
Callus
Plasmodesmata
Plant-microbe interaction
Synthetic transport

ABSTRACT

Myriads of microorganisms live in the rhizosphere, which can positively impact plant growth. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPRs) interact with roots and induce significant changes in the root system (RS). However, the signaling mechanism for modulating RS plasticity remains largely unknown. In this article, the effect of inoculation with the PGPR *Azospirillum baldaniorum* Sp245 on the RS of *Arabidopsis thaliana* was investigated using *in vitro* bioassays. After 24 h of plant-bacterium interaction, the bacteria promoted lateral roots (LRs) formation and increased expression of the auxin-responsive marker DR5:GUS in roots, with localization in LR and primary root (PR) tips. Interestingly, *A. baldaniorum* mutant PAJ0009, affected in a phenylpyruvate decarboxylase involved in the biosynthesis of indole-3-acetic acid (IAA), did not induce changes in DR5:GUS expression in roots. After, inoculation with Sp245 on PAJ0009, analysis of the expression, growth, and development of DR5:GUS seedlings, as well as of the mutant *pdp5-1* DR5:GUS and *PDLPSOE* DR5:GUS, an overexpressor line with altered callus accumulation at plasmodesmata (PD) revealed differences in marker expression and LR formation. Notably, Sp245 induced 40 % more LRs in the *pdp5-1* DR5:GUS mutant at 3 days post-inoculation compared with DR5:GUS plants, whereas in the *PDLPSOE* DR5:GUS overexpressing line, no LR induction was observed at 3- and 6-days post-inoculation. Additionally, pharmacological bioassays with the polar auxin transport inhibitor *N*-1-naphthylphthalamic acid (NPA) significantly decreased LR formation in the *pdp5-1* DR5:GUS line in the absence of Sp245. Although NPA also reduced LR formation in the presence of the bacterium, a sustained LR induction was observed in the mutant compared with the control. Our results show that *A. baldaniorum* Sp245 induces root branching through a mechanism partially dependent on auxin symplastic transport and requiring the participation of the PDLPS component.

1. Introduction

Arbuscular mycorrhizal fungi, free-living fungi, and plant growth-promoting rhizobacteria (PGPRs) form part of complex communities of soil microorganisms (Randyopadhyay et al., 2017; Vishwakarma et al., 2020; Jamil et al., 2022). These organisms interact with the root system (RS), which in the model plant *Arabidopsis thaliana* a primary root (PR), lateral roots (LRs) and root hairs consists and that is an ecological niche allow for anchoring and water and nutrients uptake.

Specifically, PGPRs plant development enhances, protect against pathogenic organisms, and reduce the effects of biotic and abiotic stresses (Randyopadhyay et al., 2017). Particularly, *Azospirillum baldaniorum* Sp245 (formerly *A. brasilense* Sp245; [dos Santos-Ferreira et al., 2020](#)). This PGPR is widely studied due to its biotechnological and agricultural importance, whose impact lies in increasing plant yield in the production of different crops, such as corn, rice, sugarcane, sorghum and some forage species (Olson and Vanderleyden, 1997; Bashan and de Bashan, 2010; Picotain et al., 2011; Casado et al., 2022; Scudetti et al., 2023).

PGPRs-induced plant growth stimulation can occur through direct and indirect mechanisms (Lui et al., 2023). Indirect mechanisms include the production of cyanide, antibiotics, and lytic enzymes that act against plant pathogen microorganisms (Kondan et al., 2015). Direct mechanisms include phosphorus solubilization, siderophore produc-

tion Sp245 (formerly *A. brasilense* Sp245; [dos Santos-Ferreira et al., 2020](#)). This PGPR is widely studied due to its biotechnological and agricultural importance, whose impact lies in increasing plant yield in the production of different crops, such as corn, rice, sugarcane, sorghum and some forage species (Olson and Vanderleyden, 1997; Bashan and de Bashan, 2010; Picotain et al., 2011; Casado et al., 2022; Scudetti et al., 2023).

* Corresponding author.

E-mail address: eldabel@umich.mx (E. Beltrán-Peña).

<https://doi.org/10.1016/j.rhizoph.2023.101160>

Received 8 June 2023; Received in revised form 21 August 2023; Accepted 21 August 2023

2452-2198/© 2023X

Note: Low-resolution images were used to create this PDF. The original images will be used in the final composition.

Elizabeth Carrillo Flores

El transporte simplástico de las auxinas participa en el desarrollo de las raíces laterales de Arabidopsis thaliana expu...

 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::3117:497471405

Fecha de entrega

12 sep 2025, 8:48 a.m. GMT-6

Fecha de descarga

12 sep 2025, 9:11 a.m. GMT-6

Nombre del archivo

El transporte simplástico de las auxinas participa en el desarrollo de las raíces laterales de Arabi....pdf

Tamaño del archivo

3.5 MB

89 páginas

23.507 palabras

127.872 caracteres

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	El transporte simplástico de las auxinas participa en el desarrollo de las raíces laterales de Arabidopsis thaliana expuesta a Azospirillum baldaniorum Sp245	
	Nombre	Correo electrónico
Autor/es	Elizabeth Carrillo Flores	elizabeth.carrillo @umich.mx
Director	Elda María Gpe. Beltrán Peña	eldabelt@umich.mx
Codirector	Asdrúbal Aguilera Méndez	amendez@umich.mx
Coordinador del programa	Ernesto García Pineda	doc.cs.biologia.experimental@umich.mx

Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	No	

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	No	

Datos del solicitante	
Nombre y firma	Elizabeth Carrillo Flores
Lugar y fecha	Morelia, Mich. 11 de septiembre de 2025