



UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS
LABORATORIO DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

**EL TRANSPORTE DE AUXINAS REGULADO POR TOR
MODULA EL DESARROLLO DE *Arabidopsis* INOCULADA CON
Azospirillum brasilense Sp245**

TESIS QUE PRESENTA:

I.B.Q. ELIZABETH CARRILLO FLORES

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. ELDA BELTRÁN PEÑA

MORELIA, MICH., MAYO DEL 2020

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Transducción de Señales del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría de la D.C. Elda Beltrán Peña. Para su realización se tuvo el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con el número de becario 7080155 y de la CIC de la UMSNH.

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
1. Antecedentes	4
1.1 La planta modelo <i>Arabidopsis thaliana</i>	4
1.2. Crecimiento y desarrollo vegetal	5
1.2.1 Características y funciones del SAM	5
1.2.2 Características y funciones del RAM	7
2.3 Reguladores del crecimiento vegetal	8
2.3.1 Arquitectura de la raíz de <i>Arabidopsis</i>	9
2.3.2 Desarrollo de las raíces laterales de <i>Arabidopsis</i>	10
2.3.3 Etapas de desarrollo de las raíces laterales	11
2.3.4 Regulación y crecimiento del desarrollo vegetal por las auxinas	13
2.3.5 Homeostasis de las auxinas	14
2.3.6 Transporte polar de las auxinas	16
2.3.7 Red de respuesta a auxinas	19
2.3.8 Citocininas	20
2.3.9 Cruce de señales entre las auxinas y las citocininas	22
2.3.10 Crecimiento de la raíz primaria dependiente de las auxinas y citocininas	23
2.4 Características de la cinasa TOR en mamíferos	24
2.4.1 Ruta de transducción de señales PI3K/TOR/S6K en mamíferos	25
2.4.2 Vía de transducción de señales de TOR en plantas	26
2.5 La rizósfera: Un microambiente complejo y dinámico	33
2.6 Interacción planta-bacteria	34
2.7 Características de <i>Azospirillum brasilense</i>	37
2.7.1 Interacción <i>Arabidopsis</i> - <i>Azospirillum</i>	38
2.7.2 Efecto de TOR en la interacción planta-microorganismo	39
3. Justificación	43
4. Hipótesis	43
5. Objetivos	44
5.1 Objetivo general	44
5.2 Objetivos específicos	44
6. Metas	44
7. Estrategia experimental	45
7.1 Estrategia experimental general	45
8. Materiales y métodos	46
8.1 Material vegetal	46
8.2 Desinfección, siembra e incubación de las semillas	46
8.3 Preparación del medio de cultivo	46
8.4 Preparación del medio de cultivo suplementado con inhibidores	46
8.5 Preparación del medio de cultivo para el mantenimiento de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp245	47

8.6	Transferencia de las plántulas a los medios de cultivo suplementados con <i>Azospirillum brasilense</i> Sp245 y con los diferentes inhibidores	47
8.7	Actividad histoquímica <i>uidA</i>	47
8.8	Evaluación de los parámetros de la arquitectura radicular de las plántulas	47
8.9	Evaluación del crecimiento de las RL (LRL)	48
8.10	Análisis de resultados	48
9.	Resultados	49
9.1	Evaluación de los parámetros de la arquitectura radicular y el nivel de auxinas en plántulas <i>DR5:uidA</i> expuestas a <i>Azospirillum</i>	49
9.2	Efecto de los inhibidores de TOR: Torin1 y AZD-8055 sobre la arquitectura radicular de plántulas de <i>Arabidopsis</i>	50
9.3	Evaluación de la arquitectura radicular y el nivel de auxinas en plántulas <i>DR5:uidA</i> expuestas a <i>Azospirillum brasilense</i> y al AZD-8055	51
9.4	Evaluación de la arquitectura radicular y el nivel de auxinas en plántulas <i>DR5:uidA</i> expuestas a <i>Azospirillum brasilense</i> y a Torin1	52
9.5	Efecto de <i>Azospirillum brasilense</i> sobre la arquitectura radicular y el nivel de auxinas en plántulas <i>tor-es1 DR5:uidA</i>	54
9.6	Efecto del NPA sobre los cambios de la arquitectura radicular en plántulas <i>tor-es1DR5:uidA</i> expuestas a <i>Azospirillum brasilense</i>	56
9.7	Efecto de <i>Azospirillum</i> sobre la arquitectura radicular de plántulas <i>tt4</i> de <i>Arabidopsis</i> expuestas a <i>Azospirillum</i>	58
9.8	Efecto del AZD-8055 sobre la arquitectura radicular de plántulas <i>pgp1, axr4-1</i> y <i>ben2</i> expuestas a <i>Azospirillum brasilense</i>	60
9.9	Efecto del AZD-8055 sobre la división celular de las meristemos de las raíces laterales de <i>Arabidopsis</i> expuestas a <i>Azospirillum</i>	62
9.10	Efecto del AZD-8055 sobre la elongación celular de las raíces laterales de plántulas de <i>Arabidopsis</i> expuestas a <i>Azospirillum</i>	63
9.11	Efecto de diferentes concentraciones de AIA sobre los parámetros de la arquitectura radicular de plántulas <i>DR5:uidA</i>	64
9.12	Efecto de diferentes concentraciones de <i>Azospirillum</i> sobre la arquitectura radicular de plántulas <i>DR5:uidA</i>	66
9.13	Evaluación de la arquitectura radicular de plántulas de semillas sembradas directamente sobre el medio de cultivo y expuestas a diferentes concentraciones de <i>Azospirillum brasilense</i> .	67
9.14	Efecto de diferentes concentraciones del AIA sobre la arquitectura radicular de plántulas <i>tor-es1DR5:uidA</i>	70
9.15	Efecto de <i>Azospirillum</i> sobre la arquitectura radicular de plántulas <i>35S:YUCCA4DR5:uidA</i> y <i>yucca6 yucca3</i>	71
9.16	Efecto de la yucasina sobre la arquitectura radicular de plántulas <i>DR5:uidA</i> expuestas a <i>Azospirillum</i>	73
9.17	Efecto de <i>Azospirillum</i> sobre el desarrollo vegetativo y reproductivo de <i>Arabidopsis</i>	75
10.	Discusión	77
11.	Conclusiones	88

12. Perspectivas	88
13. Bibliografía	84

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de una plántula y una planta adulta de <i>Arabidopsis thaliana</i> -----	4
Figura 2. Morfología del SAM y del meristemo floral -----	6
Figura 3. Crecimiento, desarrollo y mecanismo molecular involucrado en el mantenimiento del meristemo radicular de <i>Arabidopsis</i> -----	8
Figura 4. Raíz primaria de <i>Arabidopsis</i> -----	10
Figura 5. Desarrollo de las raíces laterales de <i>Arabidopsis thaliana</i> -----	11
Figura 6. Cambios morfológicos durante el proceso de formación de raíces laterales de <i>Arabidopsis</i> -----	12
Figura 7. Las auxinas controlan el desarrollo de las RL a través de múltiples módulos de señalización -----	13
Figura 8. Vía de respuesta a las auxinas -----	14
Figura 9. Vías de síntesis del AIA -----	16
Figura 10. Transporte de las auxinas -----	17
Figura 11. Estructura molecular y posicionamiento de las PIN -----	18
Figura 12. Modelo de la señalización por auxinas -----	20
Figura 13. Modelo de la síntesis y la vía de señalización de las citocininas -----	22
Figura 14. El antagonismo entre las auxinas y las CK sobre el crecimiento de la raíz primaria y el desarrollo de las raíces laterales de <i>Arabidopsis</i> -----	22
Figura 15. Cruce de señales entre las citocininas y las auxinas controla el tamaño del meristemo de la raíz en <i>Arabidopsis</i> -----	23
Figura 16. La estructura de TOR y sus complejos -----	25
Figura 17. Cascada de señalización PI3K/AKT/mTOR y sus principales efectores río abajo -----	26
Figura 18. Componentes de la vía TOR en plantas -----	28
Figura 19. Efectores y blancos del complejo TORC1 en plantas -----	30
Figura 20. Efecto de la alteración de los niveles de TOR y de su actividad sobre el desarrollo de <i>Arabidopsis</i> -----	31
Figura 21. La reactivación de la división celular del meristemo apical y radicular y la fosforilación de RPS6 estimulada por la luz dependen de TOR -----	32
Figura 22. TOR es activada por diferentes efectores -----	33
Figura 23. Las PGPR modulan el desarrollo de la raíz a través de la producción de fitohormonas, metabolitos secundarios y enzimas -----	35
Figura 24. Efecto de la interacción planta-PGPR -----	36
Figura 25. Las bacterias influyen sobre la fisiología vegetal y el desarrollo de la arquitectura radicular de la planta -----	37
Figura 26. <i>Azospirillum brasilense</i> -----	38
Figura 27. Efecto de <i>Azospirillum</i> sobre el número de raíces laterales en plántulas de <i>Arabidopsis</i> -----	39
Figura 28. Fenotipo de los IT y de los nódulos en la raíz de frijol inoculada con <i>R. tropici</i> -----	41
Figura 29. TOR regula el desarrollo y las mutantes de <i>RAPTOR</i> en arroz presentan resistencia a <i>Xanthomonas oryzae</i> pv -----	42

Figura 30. Las mutantes del complejo <i>TORC1</i> de <i>Arabidopsis</i> presentan resistencia a la infección de <i>Fusarium graminearum</i> -----	43
Figura 31. Efecto de <i>Azospirillum brasilense</i> sobre la arquitectura radicular y el nivel de auxinas en plántulas <i>DR5:uidA</i> de <i>Arabidopsis</i> -----	49
Figura 32. Efecto de Torin1 y AZD-8055 sobre la arquitectura radicular de plántulas de <i>Arabidopsis</i> -----	50
Figura 33. Efecto del AZD-8055 sobre la arquitectura radicular de plántulas <i>DR5:uidA</i> expuestas a <i>Azospirillum brasilense</i> -----	52
Figura 34. Efecto de Torin1 sobre la arquitectura radicular de plántulas <i>DR5:uidA</i> expuestas a <i>Azospirillum</i> -----	53
Figura 35. Efecto del estradiol sobre la arquitectura radicular y el nivel de auxinas de plántulas <i>tor-es1DR5:uidA</i> expuestas a <i>Azospirillum</i> -----	55
Figura 36. Efecto del NPA sobre la arquitectura radicular y el nivel de auxinas de plántulas <i>tor-es1DR5:uidA</i> expuestas a <i>Azospirillum</i> -----	57
Figura 37. Efecto de <i>Azospirillum</i> sobre la arquitectura radicular de plántulas <i>tt4</i> de <i>Arabidopsis</i> -----	59
Figura 38. Efecto del AZD-8055 sobre la arquitectura radicular de plántulas <i>pgp1</i> , <i>axr4-1</i> y <i>ben2</i> expuestas a <i>Azospirillum</i> -----	61
Figura 39. <i>Azospirillum brasilense</i> Sp245 y AZD-8055 alteran la expresión de <i>CyB1:uidA</i> en las raíces laterales de <i>Arabidopsis</i> -----	62
Figura 40. <i>Azospirillum brasilense</i> Sp245 y AZD-8055 alteran la expresión de <i>Exp7:uidA</i> en la raíz lateral de <i>Arabidopsis</i> -----	63
Figura 41. Efecto de diferentes concentraciones del AIA sobre el sistema radicular de plántulas <i>DR5:uidA</i> -----	65
Figura 42. Efecto de diferentes concentraciones de <i>Azospirillum brasilense</i> sobre la arquitectura radicular de plántulas <i>DR5:uidA</i> 11 dde -----	66
Figura 43. Efecto de la concentración de <i>Azospirillum</i> sobre la AR y el nivel de auxinas en las plántulas <i>DR5:uidA</i> de 7 y 14 dde -----	68
Figura 44. Crecimiento de <i>Azospirillum</i> en interacción con plántulas de <i>Arabidopsis</i> durante 7 y 14 días -----	69
Figura 45. Efecto de diferentes concentraciones de AIA sobre los parámetros de la arquitectura radicular de plántulas <i>tor-es1DR5:uidA</i> de 11 dde -----	70
Figura 46. Efecto de <i>Azospirillum</i> sobre la arquitectura radicular de plántulas <i>35S:YUCCA4 DR5:uidA</i> y <i>yucca 3 yucca6</i> -----	72
Figura 47. Efecto de la yucasina sobre la arquitectura radicular de plántulas de <i>Arabidopsis</i> expuestas a <i>Azospirillum</i> -----	74
Figura 48. Efecto de la yucasina en plántulas <i>DR5:uidA</i> expuestas a <i>Azospirillum</i> ----	75
Figura 49. Cinética de crecimiento de <i>Arabidopsis</i> en suelo después de la interacción con <i>Azospirillum brasilense</i> -----	76
Figura 50. Modelo de la participación de TOR durante la interacción <i>Arabidopsis-Azospirillum</i> -----	82

RESUMEN

La proteína blanco de rapamicina (TOR, por sus siglas en inglés), es una cinasa conservada evolutivamente entre los organismos eucariontes, que tiene una función central en la percepción del estado nutricional y energético de la célula, de los factores de crecimiento y de otras señales ambientales. Por otro lado, *Azospirillum brasilense* Sp245 es una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal que vive en el suelo y sobre las raíces de las plantas y sintetiza ácido indolacético (AIA). Esta fitohormona que regula el crecimiento vegetal desde la germinación de la semilla hasta la senescencia, se produce en los brotes jóvenes de la parte aérea de la planta y es movilizada hacia la raíz a través del transporte polar de auxinas (PAT). Dicho transporte requiere de las proteínas de influjo AUX/LAX y las de eflujo PIN. Durante la interacción *Arabidopsis*-*Azospirillum*, la bacteria provoca en la planta un incremento del número de raíces laterales, el cual depende del PAT y de las proteínas AXR4-1, BEN2 y PGP1 involucradas también en el transporte de auxinas. En este estudio se investigó la participación de TOR sobre el PAT en la interacción *Azospirillum*-*Arabidopsis*, utilizando ensayos de inhibición de TOR con Torin1 y AZD-8055, además de la línea mutante condicionada a estradiol *tor-es1 DR5:uidA* de *A. thaliana*. Los resultados de estos experimentos mostraron que en las plántulas expuestas a ambos inhibidores y en presencia de *A. brasilense*, TOR solamente participa en el crecimiento de las raíces laterales (RL). Mientras que en las plántulas *tor-es1 DR5:uidA* en presencia de *A. brasilense*, se redujo el número y el crecimiento de las RL, indicativo de que el efecto en la mutante fue más severo que la inhibición de TOR. Respecto a la participación de TOR en el PAT, se observó que esta cinasa está involucrada en la regulación de dicho transporte. Además, con el empleo de las líneas reporteras *CyB1:uidA* y *Exp7:uidA* se encontró que la detención del crecimiento de las RL de *Arabidopsis* en presencia de la bacteria, se debe tanto al arresto de la división celular del meristemo como a la desaparición de la zona de elongación, es decir, *A. brasilense* afecta los dos procesos celulares involucrados en el crecimiento.

Palabras clave: TOR, PAT, *A. brasilense*, *Arabidopsis*

ABSTRACT

Target of Rapamycin (TOR) is an evolutionarily conserved kinase among eukaryotic organisms, having a central role in perception of cell nutritional and energy status, growth factors, and others environmental signs. On the other hand, *Azospirillum brasilense* Sp245 is a plant growth promoting rhizobacterium that lives in soil and on plant roots and produces AIA. This phytohormone that regulates from seed germination to senescence, is synthesized in young shoots of aerial part and is mobilized towards the root through the polar auxins transport (PAT). Such transport requires the AUX/LAX influx proteins and the PIN efflux proteins. During the *Arabidopsis-Azospirillum* interaction, the bacteria causes an increase of number of lateral roots, which depends on PAT and AXR4-1, BEN2 and PGP1 proteins also involved in auxin transport. In this study, we investigated whether TOR participates in the *Azospirillum-Arabidopsis* interaction. To achieve this goal, TOR inhibitors: Torin1 and AZD-8055 were used, in addition to the mutant line conditioned to estradiol *tor-es1 DR5: uidA* of *A. thaliana*. The results of these experiments showed that seedlings exposed to both inhibitors and in the presence of *A. brasilense*, TOR only participates in the growth of lateral roots (RL). While *intor-es1 DR5: uidA* seedlings in presence of *A. brasilense*, both the number and growth of the RL were reduced, that is, the effect in the mutant was more severe than the inhibition of TOR. Regarding the participation of TOR in the PAT, it was observed that this kinase is involved in the regulation of this transport. Furthermore, with the use of reporting lines *CyB1: uidA* and *Exp7: uidA*, it was found that the growth arrest of *Arabidopsis* RL in the presence of the bacterium is due to both the arrest of meristem cell division and the disappearance of the elongation zone, that is, *A. brasilense* affects the two cellular processes involved in growth. Subsequently, the participation of endogenous AIA synthesis in the *Arabidopsis-Azospirillum* interaction was analyzed, using yucasin (YUCCA inhibitor) and the results showed that bacterial auxins reduces the PR length and increase NRL in *Arabidopsis* seedlings.

Key words: TOR, PAT, *A. brasilense*, *Arabidopsis*

INTRODUCCIÓN

En células de mamíferos y levaduras, TOR actúa como el componente catalítico en dos complejos proteicos estructural y funcionalmente distintos denominados TORC1 y TORC2. La rapamicina, el primer inhibidor de TOR descubierto es un macrólido antifúngico producido por *Streptomyces hygroscopicus*, aislado del suelo de la isla de Pascua (Vezina *et al.*, 1975). Varias décadas han pasado desde que se reportó que las plantas eran insensibles a la rapamicina, lo cual se atribuyó a las diferencias estructurales de la proteína FKBP12 que une a la rapamicina, razón por la cual no podía formar el complejo inhibidor rapamicina/FKBP12/TOR (Menand *et al.*, 2002; Sormani *et al.*, 2007). Sin embargo, Xiong y Sheen 2012 reportaron que *Arabidopsis* en condiciones de crecimiento sumergido presentaba sensibilidad a la rapamicina.

Las plantas al ser organismos sésiles se adaptan a su entorno con una notable plasticidad de crecimiento generando órganos durante todo su ciclo de vida, a través de la actividad de un grupo de células pluripotentes conocidas como meristemas. Por otra parte, el sistema radicular de las plantas interacciona con diversos organismos que se encuentran en el suelo; estos microorganismos pueden regular la arquitectura de la raíz mediante la secreción de diferentes moléculas y de esta manera ocasionan un efecto positivo o negativo sobre el desarrollo vegetal (Padje *et al.*, 2016). Entre estos organismos se encuentra *Azospirillum brasilense* Sp245, una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) que vive en el suelo y sobre las raíces de las plantas.

El mecanismo propuesto por el cual *Azospirillum* promueve el crecimiento vegetal, involucra a las auxinas bacterianas (Lugtenberg y Kamilova, 2009; Spaepen *et al.*, 2009; Spaepen *et al.*, 2014), las cuales modifican la morfología de la raíz de la planta, disminuyendo la longitud de la raíz primaria e incrementando el número de raíces laterales y de los pelos radiculares. También, las auxinas tienen una función importante en el crecimiento y desarrollo vegetal, además esta hormona puede activar la vía de señalización de TOR para modular la transcripción, traducción y reiniciación de la traducción de mRNAs específicos (Deng *et al.*, 2016). Por otra parte, Nanjareddy y colaboradores 2016, mostraron que TOR está involucrado en la interacción del *Rhizobium* con las raíces del frijol. También, se ha reportado que la disminución en la expresión de TOR en *Arabidopsis*, le confiere resistencia al hongo *Fusarium graminearum* (Aznar *et al.*, 2018).

Sun *et al.*, 2018, observaron que la señalización de TOR controla la infección del arroz por el hongo *M. oryzae*, mientras que Arreola Rivera (2018), reportó que en la interacción *Arabidopsis*-*Azospirillum* se requiere que esté activo el transporte polar de auxinas (PAT, por sus siglas en inglés) para que la bacteria incremente el número de raíces laterales en las plántulas inoculadas.

En el presente estudio se investigó la participación de TOR sobre la regulación de PAT en plántulas de *Arabidopsis* inoculadas con *A. brasilense* Sp245.

1. ANTECEDENTES

1.1 La planta modelo *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana es una dicotiledónea que pertenece a la familia de las *Brassicaceae*, con una amplia distribución en Europa, Asia y Norteamérica donde crece en suelos bien drenados y ricos en materia orgánica. El ciclo de vida de *Arabidopsis* desde la germinación de las semillas hasta el florecimiento y maduración de las éstas, se completa entre 6 y 8 semanas, y su desarrollo no depende de ninguna época del año (Wilson, 2000). El genoma de *Arabidopsis* completamente secuenciado, está constituido de 125 millones de bases que codifican aproximadamente para 25000 genes, lo cual ha permitido desarrollar procedimientos de mutagenesis química e insercional y métodos eficientes para llevar a cabo cruza e introducir DNA a través de la transformación de plantas.

Debido a lo antes mencionado, se dispone de colecciones extensas de mutantes con fenotipos diversos y una gran variedad de mapas cromosómicos de genes mutados y marcadores moleculares (Meinke *et al.*, 1998). La planta adulta de *Arabidopsis* está formada por una roseta de 2-4 cm de diámetro aproximadamente de donde emerge un tallo floral que alcanza una altura de 20-70 cm, las hojas caulinas se desprenden a lo largo del tallo, además presenta vainas alargadas denominadas sílicuas. Las inflorescencias se presentan en racimos en el extremo del tallo, donde se van separando a medida que el tallo crece (Fig. 1).

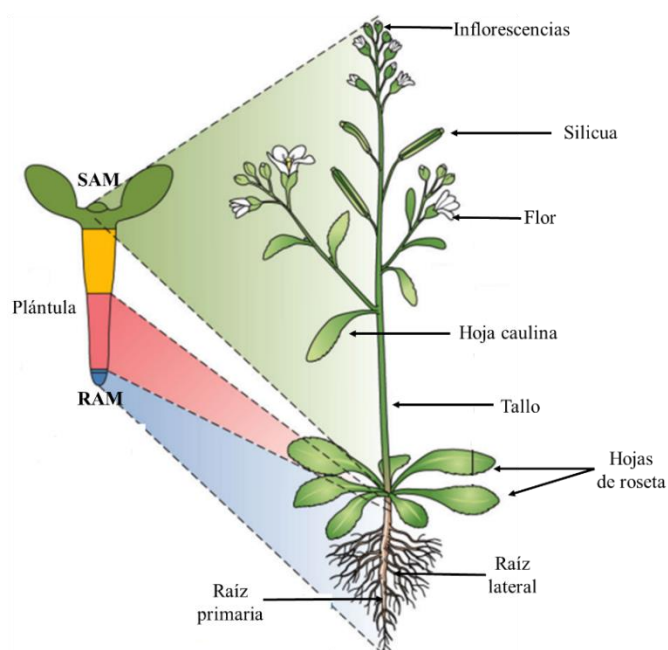


Figura 1. Esquema de una plántula y una planta adulta de *Arabidopsis thaliana*. En medio de los coltiledones se localiza el meristemo apical del brote (SAM), que producirá nuevos órganos y tejidos aéreos, mientras que el meristemo apical de la raíz (RAM) se ubica en la punta de la raíz. *Arabidopsis* presenta una pequeña roseta en la etapa vegetativa a partir de la cual crecen los tallos florales y se producen los frutos denominados sílicuas (Wilson, 2000).

1.2 Crecimiento y desarrollo vegetal

Las plantas son organismos sésiles que tienen que adaptarse a diferentes estímulos ambientales coordinando su crecimiento y desarrollo. Debido a estas necesidades, han desarrollado un alto grado de plasticidad morfológica que les permite un crecimiento continuo (Bradshaw, 1965; Palmer *et al.*, 2012). A diferencia de los animales, las plantas producen la mayoría de sus órganos a partir de meristemos pos-embriónarios, los cuales contienen células fuente pluripotentes, que se mantienen durante toda su vida. Existen dos meristemos principales, el meristemo apical del brote (SAM, por sus siglas en inglés) que genera tejidos y órganos por encima del suelo y el meristemo apical de la raíz (RAM, por sus siglas en inglés), que da origen a la raíz.

El RAM y el SAM muestran diferentes organizaciones estructurales, pero ambos albergan un nicho de células fuente (SCN, por sus siglas en inglés), que genera continuamente nuevas células (Benfey y Scheres, 2000).

En *Arabidopsis* en el RAM, el SCN está conformado por un centro quiescente (QC, por sus siglas en inglés), que contiene cuatro células que se dividen lentamente y mantiene a las células iniciales (IC, por sus siglas en inglés) (van den Berg *et al.*, 1997), que lo rodean y se dividen continuamente generando nuevas células que se mantienen en contacto con el QC y otras células hijas experimentan más divisiones celulares para posteriormente diferenciarse.

1.2.1 Características y funciones del SAM

El SAM se localiza en la parte superior de la planta y es el responsable del crecimiento pos-embriionario que da lugar a las estructuras aéreas (Fig. 2a). Para sostener adecuadamente un crecimiento continuo, este meristemo mantiene el equilibrio entre la autorrenovación de las células iniciales y el reclutamiento de células para la formación de órganos laterales. Las células iniciales del SAM producen células hijas, donde algunas permanecen indiferenciadas, mientras que otras se diferencian. El SAM también establece la filotaxia, es decir, la disposición de los órganos laterales a lo largo del tallo (Mandel *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2019).

En *Arabidopsis thaliana*, el SAM produce hojas de roseta durante la fase vegetativa y justo después de la transición floral genera algunas hojas caulinas (Wang y Li, 2008) y durante la fase reproductiva; a partir de éstese producen las flores (Fig. 2a).

A la fecha se ha utilizado a la planta modelo *A. thaliana* para dilucidar la estructura del SAM, la cual consiste de un domo de varias capas que contiene aproximadamente 500 células que se subdividen en diferentes capas y zonas. La capa L1 que es la más externa está compuesta de células epidérmicas, mientras que L2 de subepidérmicas. L1 y L2 son capas de células individuales que se dividen anticlinalmente en el plano de la superficie del SAM y debajo de ellas, las células se dividen tanto periclinal como anticlinalmente a la superficie del SAM formando múltiples capas internas llamadas colectivamente L3 o corpus.

Además, el SAM alberga un conjunto de IC dentro de la zona central (CZ, por sus siglas en inglés) rodeada por la zona periférica (PZ, por sus siglas en inglés); las células ubicadas en la CZ se dividen lentamente, mientras que las de la PZ lo hacen rápidamente (Fig. 2c). El equilibrio de la división celular en la CZ y PZ determina el tamaño y el número de órganos. La PZ produce órganos laterales, mientras que, la zona denominada costilla del meristemo (RZ, por sus siglas en inglés), se diferencia gradualmente a lo largo del eje apical-basal para formar el tallo de la planta. La actividad de la CZ es mantenida por el centro organizador (OC, por sus siglas en inglés) subyacente, donde ambas estructuras se superponen parcialmente para formar el SCN (Carles y Fletcher, 2003; Adibi *et al.*, 2016).

La actividad meristemática del SAM depende del factor de transcripción WUSCHEL (WUS) y del sistema ligando-receptor CLAVATA (CLV) (Shoof *et al.*, 2000). WUS se expresa en el OC y controla los procesos biológicos a través de la regulación transcripcional río abajo de genes blanco relacionados con el crecimiento del meristemo, la división celular y la señalización hormonal (Lenhard *et al.*, 2002; Aichinger *et al.*, 2012). Por otro lado, CLV3 que se expresa en la CZ codifica para un miembro de la familia de péptidos pequeños CLAVATA3/ESR-RELATED (CLE, por sus siglas en inglés), los cuales se unen al receptor tipo cinasa CLV1, que contiene un dominio de repetición extracelular rico en leucina y otro con función de cinasa intracelular (Jeonget *et al.*, 1999; Carlesy Fletcher, 2003; Fiers *et al.*, 2007; Ohyama *et al.*, 2009). El circuito de retroalimentación negativa entre las células iniciales y el OC mediado por estas dos proteínas asegura la homeostasis de las células fuente del SAM y la formación indefinida de órganos. Los componentes de la vía de retroalimentación negativa CLV-WUS están conservados en *Arabidopsis* y otras plantas como el arroz (*Oryza sativa*).

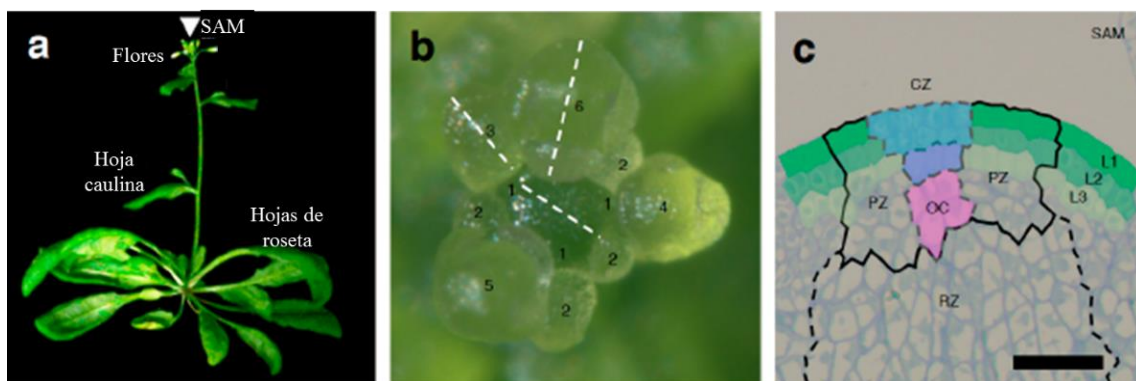


Figura 2. Morfología del SAM y del meristemo floral. a) Planta de *Arabidopsis* de 30 días de edad, cuyos tejidos aéreos se forman a partir del SAM (Punta de flecha). b) Vista del SAM, los números indican las etapas florales. c) La organización del SAM muestra las zonas funcionales y las diferentes capas, la CZ consiste de las células iniciales (azul) y el centro organizador (OC) (rosa). PZ y RZ son la zona periférica y la costilla del meristemo respectivamente. La capa epidermal (L1) y subepidermal (L2) se muestran en verde y verde claro, respectivamente (Lee *et al.*, 2019).

1.2.2 Características y función del RAM

Como resultado de que las plantas se adaptan a las demandas ambientales, se ha sugerido que el RAM probablemente evolucionó a partir del SAM; aunque a nivel celular la organización y el funcionamiento de las células fuente del meristemo de la raíz y del brote son totalmente diferentes. En el RAM, todas las capas celulares están organizadas en un patrón radial simple. En la zona meristemática (ZM) de la raíz primaria (RP) se localiza el SCN, establecido durante la embriogénesis y conformado por el QC que mantiene el estado de las células iniciales que lo rodean a través de señales no autónomas de corto alcance que inhiben la diferenciación celular. El mantenimiento del SCN depende de la actividad de los factores de transcripción SCARECROW (SCR, por sus siglas en inglés), PLETHORA (PLT, por sus siglas en inglés), SHORT-ROOT (SHR, por sus siglas en inglés) y WUSHEL RELATED HOMEBOX5 (WOX, por sus siglas en inglés), este último, necesario para el mantenimiento de las IC. En la figura 3b se muestra que el receptor de las citocininas (CK), ACR4 es requerido para restringir la división celular de las IC que dan origen a la columela. La expresión de *PLT* es inducida por las auxinas y su dominio de actividad está restringido por los acarreadores de eflujo PIN; a su vez los PLT sostienen la transcripción de los PIN. Este circuito de retroalimentación es necesario para mantener la actividad de las IC y el crecimiento del meristemo (Moubayidin *et al.*, 2009).

Después de la división de una célula inicial, las descendientes que aún están en contacto con el QC mantienen su destino de célula fuente, mientras que las otras se convierten en células amplificadoras en tránsito. Después de otras divisiones, las células alcanzan la zona de elongación (ZE) donde se expanden y adquieren su destino en la zona de diferenciación (ZD) (Fig. 3b) (Dolan *et al.*, 1993; Stahl y Simon, 2005; Perili *et al.*, 2012).

El límite entre las células en división y expansión se denomina zona de transición (ZT), donde se inicia la diferenciación celular. Como consecuencia, el equilibrio entre estos dos procesos competitivos que incluyen la división y la diferenciación celular mantienen el tamaño del RAM (Fig. 3a). En la ZT, las CK inducen la diferenciación celular a través de la regulación positiva del factor SHY2, mediada por los factores de transcripción ARR12 y ARR1 que responden a las CK. SHY2 a su vez reprime a los *PIN*, limitando así a PLT. Por otro lado, el AIA (ácido indolacético) promueve la degradación de SHY2, manteniendo así la actividad del PIN y la división celular en la ZM. La expresión de ARR1 está también controlada por la proteína DELLA RGA, cuya estabilidad depende de los niveles del ácido giberélico (GA, por sus siglas en inglés) mientras que su biosíntesis a su vez, depende de las auxinas (Fig. 3b) (Moubayidin *et al.*, 2009).

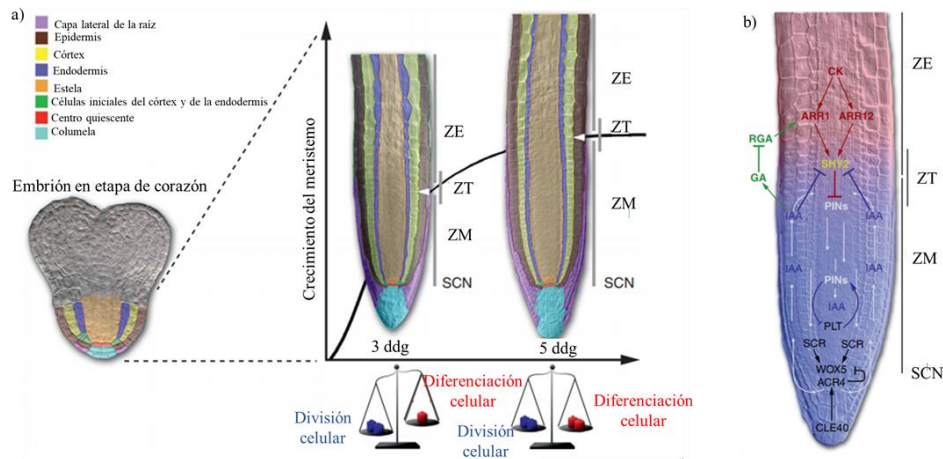


Figura 3. Crecimiento, desarrollo y mecanismo molecular involucrado en el mantenimiento del meristemo radicular de *Arabidopsis*. a) La organización del tejido embrionario en la etapa de corazón y el desarrollo del RAM de *Arabidopsis* tres días después de la germinación (ddg). El tamaño del RAM aumenta rápidamente debido a la prevalencia de la división celular, mientras que a los 5 ddg, dicho incremento se logra por un aumento en la velocidad de diferenciación que iguala a la de división celular (Perilli *et al.*, 2012). b) Organización de las zonas de la raíz de *Arabidopsis*, en azul se presenta el dominio de actividad auxínica y en rojo el de las citocininas (Moubayidin *et al.*, 2009).

En la etapa globular tardía de la embriogénesis, la hipófisis sufre una división periclinal para generar una célula superior en forma de lente y una basal que dará lugar a la columela en la punta de la raíz. El patrón correcto y la especificación del RAM se lleva a cabo mediante las auxinas y varios factores de transcripción que regulan la división celular y el equilibrio de la diferenciación en las raíces a través del efecto de las CK y las auxinas (Weijers *et al.*, 2006).

Los reguladores de respuesta a las auxinas, AUX/IAA-ARF junto con BODENLOS(BDL) y MONOPTEROS (MP), modulan la señalización de las auxinas y proporcionan la información correcta del patrón mediante la activación de los genes *PLT* (Kim *et al.*, 1997). Los miembros de la familia GRAS, incluidos los reguladores transcripcionales *SHR* y *SCR*, son cruciales para el establecimiento del patrón radial y la renovación de las células iniciales en la raíz de *Arabidopsis*. Los factores de transcripción *PLT* funcionan posteriormente junto con *SHR*, que se mueve desde la estela por encima del QC a las células del QC; mientras que *SCR* se activa por *SHR*, para especificar la identidad del QC. Las auxinas en el tejido de meristemo proximal median la degradación de la proteína *SHY2*, promoviendo la división celular. En *Arabidopsis*, en el RAM actúan múltiples mecanismos de regulación, como las interacciones sostenidas entre los factores de transcripción *SHR*, *SCR* y de otros factores como *PLT1*, *PLT2*; Baby Boom (BBM, por sus siglas en inglés), *CLAVATA LIKE40* (*CLE40*, por sus siglas en inglés) y *WOX5* (Fig. 3).

2.3 Reguladores del crecimiento vegetal

Debido al estilo de vida sésil, las plantas deben integrar diversos estímulos tanto bióticos como abióticos para responder al ambiente siempre cambiante y sobrevivir. Entre los

factores bióticos se encuentran los organismos polinizadores, herbívoros, patógenos, parásitos, simbioses y otras plantas, mientras que los abióticos incluyen: la gravedad, la luz, el viento, la temperatura, los gases, la humedad ambiental, el pH del suelo y la disponibilidad de agua y nutrientes. Todos estos factores son percibidos por la planta como señales externas, que en conjunto con las internas convergen en la activación de moléculas pequeñas derivadas del metabolismo secundario conocidas como fitohormonas, fitoreguladores, hormonas vegetales o reguladores del crecimiento vegetal. Estas fitohormonas integran las señales ambientales y de desarrollo en una red de señalización, que no solo forma la arquitectura de la planta sino que también la prepara para responder a los diferentes tipos de estrés ambiental de manera adecuada. Las hormonas de defensa como el ácido salicílico (SA, por sus siglas en inglés), el ácido jasmónico (JA, por sus siglas en inglés) y el etileno, también afectan múltiples procesos del desarrollo. Por ejemplo, el JA reprime el crecimiento, la fertilidad y desarrollo de la flor, mientras que el SA regula los tiempos de floración y el etileno regula la senescencia, maduración del fruto, germinación y crecimiento del pelo radicular. Otras fitohormonas, como las auxinas, el ácido giberélico y los brasinoesteroides, son consideradas como reguladores del crecimiento vegetal (Kazan y Manners, 2009).

Las vías de señalización de las hormonas antes mencionadas se clasifican en tres categorías: 1) señalización mediada por la caja-F para las auxinas, JA, GA y las estrigolactonas, donde el represor es etiquetado para su destrucción vía ubiquitinización, 2) las CK y el etileno utilizan la vía de dos componentes, mediante la cual por fosfotransferencia se transmite la señal desde los receptores unidos a la membrana, hasta sus blancos río abajo. Mientras que el ácido abscísico (ABA, por sus siglas en inglés) y los brasinoesteroides no entran en ninguna de las categorías antes mencionadas (Bowman *et al.*, 2019).

2.3.1 Arquitectura de la raíz de *Arabidopsis*

La raíz lleva a cabo una gran variedad de funciones, como mantener a la planta vertical y anclada al suelo, participar en la absorción de nutrientes y agua y también constituye un órgano importante de almacenamiento de nutrientes en algunas especies. Las raíces producen auxinas, CK y metabolitos secundarios como flavonoides y alcaloides, estos últimos involucrados en la defensa contra patógenos (López-Bucio *et al.*, 2003). La arquitectura radicular de *A. thaliana*, está conformada por la raíz primaria (RP), los pelos radiculares (PR) y las raíces laterales (RL). La RP se divide en cuatro zonas: meristemática (ZM), de transición (ZT), de elongación (ZE) y la de diferenciación (ZD) donde se forman los pelos radiculares y las raíces laterales. La ZM que es la más cercana a la columela (caliptra), mide alrededor de 200 μm y se caracteriza por tener alta actividad mitótica que le permite generar los distintos tipos de células que conforman a la raíz. Posteriormente, se encuentra la ZT que abarca 320 μm , aquí las células comienzan a crecer lentamente, tanto en amplitud como en longitud para posteriormente alargarse en la ZE, la cual mide aproximadamente 330 μm ; mientras que en la ZD las células dejan de crecer y alcanzan un estado maduro donde algunas células de la epidermis desarrollan los pelos radiculares (Montiel *et al.*, 2004; Barrada *et al.*, 2015) (Fig. 4b).

Los PR incrementan el 70% del área de la superficie de la raíz, lo que permite a la planta adquirir agua y nutrientes y aumentar el área de interacción con los microorganismos (López-Bucio, 2003). Tanto la RP como las RL están formadas por distintos tipos de capas celulares: la epidermis, el córtex y la endodermis que presentan un arreglo de cilindros concéntricos que rodean al periciclo y al haz vascular. Mientras que la cofia y la columela se localizan en la punta de la raíz para protegerla de la fricción durante la exploración del suelo (Fig. 4a). Todos los tejidos de la raíz surgen a partir de un conjunto de IC, las cuales se mantienen en un estado indiferenciado mediante eventos de señalización provenientes de un grupo pequeño de células con escasa actividad mitótica, a las cuales se les conoce como QC, rodeado por las IC, el cual se denomina el SCN (Barrada *et al.*, 2015).

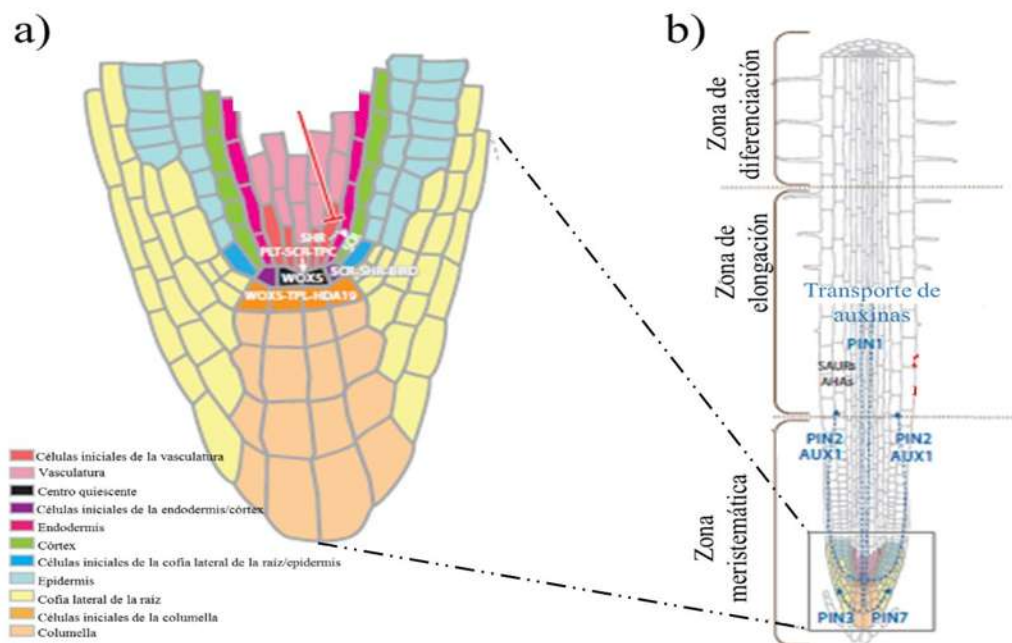


Figura 4. Raíz primaria de *Arabidopsis*. a) Vista detallada del RAM. b) Se muestran las diferentes zonas de la RP, cuyo crecimiento depende de la división y elongación celular, ambos procesos regulados por las auxinas y también por su transporte (indicado con flechas azules discontinuas). En la ZE, las auxinas inducen la expansión celular a través de la actividad de los factores de transcripción Small Auxin Up RNA (SAUR), de las enzimas plasma membrane-localized H^+ ATPase (AHA) y de las proteínas que modifican la pared celular (Motte *et al.*, 2019).

2.3.2 Desarrollo de las raíces laterales de *Arabidopsis*

Las RL son órganos pos-embrionarios que se forman en la zona de diferenciación de la RP a partir de algunas células del periciclo posicionadas en forma adyacente a los polos del xilema y son muy importantes porque participan en la absorción de nutrientes y agua. La iniciación del desarrollo de las RL ocurre en la ZD, donde las células del periciclo no se están dividiendo, pero una vez estimuladas por las auxinas se desdiferencian y proliferan formando un primordio de la raíz lateral (PRL). Dicho primordio crece y atraviesa las diferentes capas de la raíz primaria y finalmente emerge rompiendo la epidermis. El desarrollo de las RL comprende las siguientes etapas: primación, iniciación

y elongación, en la primera las células del periciclo localizadas en la zona oscilatoria (ZO) (zona de transición entre la meristemática y la de elongación), conocidas como células fundadoras son marcadas por las auxinas. Posteriormente, en el sitio de pre-ramificación, ocurre el establecimiento de la identidad de estas células. Mientras que en la etapa de iniciación de los PRL, altos niveles de auxinas promueven que las células del periciclo sufran una división anticlinal que genera dos células hijas centrales, las cuales posteriormente se dividen periclinalmente, generando así varias capas que dan lugar al PRL. Finalmente en la etapa de elongación el primordio emerge rompiendo las diferentes capas de la RP, y se forma entonces la nueva raíz lateral (Fig. 5) (Laskowski y ten Tusscher, 2017).

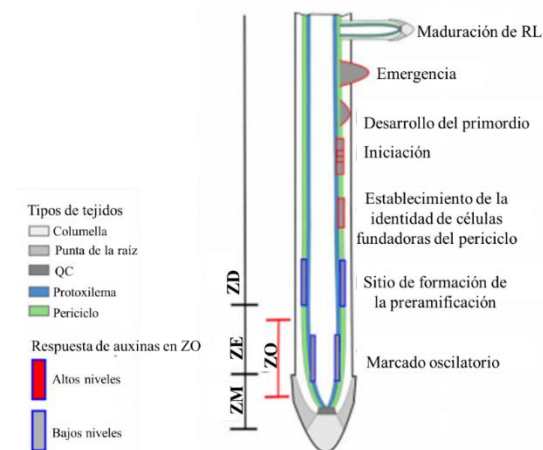


Figura 5. Desarrollo de las raíces laterales de *Arabidopsis thaliana*. El esquema muestra el desarrollo de las RL de *A. thaliana* desde la ZM de la RP transitando hacia la ZO, donde las células fundadoras del periciclo son marcadas en respuesta a las auxinas. En la ZD ocurre la pre-ramificación de estas células. Posteriormente, una alta concentración de auxinas promueve la división anticlinal y periclinal de las células fundadoras del periciclo a partir de las cuales se desarrolla el PRL hasta su emergencia (Laskowski y ten Tusscher, 2017).

2.3.3 Etapas del desarrollo de las raíces laterales

Se ha sugerido que la formación de RL puede ocurrir a través de dos procesos: i) la estimulación de la diferenciación y proliferación en la capa del periciclo que formara el PRL, el cual crece a través de las capas sobrepuestas de la célula de la RP y eventualmente surge rompiendo la epidermis y ii) la formación del meristemo de la raíz lateral. Malamy y Benfey 1997, clasifican el desarrollo de las RL en las siguientes etapas: I) iniciación del primordio en un plano longitudinal, con aproximadamente 8 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) ocurre la diferenciación de la raíz al romper la epidermis y formar una raíz lateral (Fig. 6).

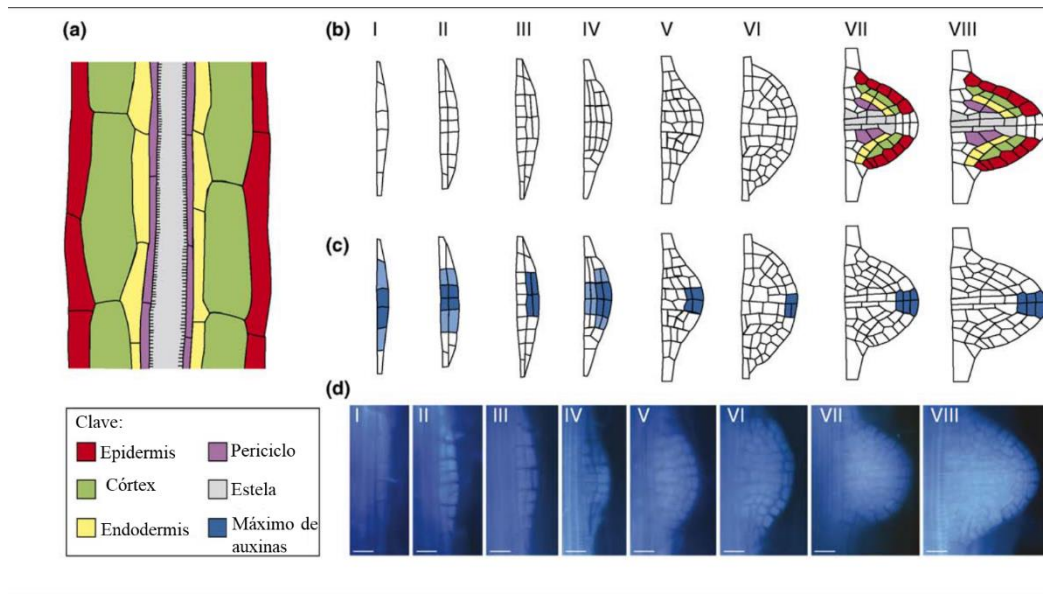


Figura 6. Cambios morfológicos durante el proceso de formación de las raíces laterales de *Arabidopsis*. **a)** Las RL se originan de la RP a partir de células del periciclo. **b)** Estados de desarrollo de los PRL reportados por Malamy y Benfey, 1997. **c)** Se puede observar en color azul el establecimiento del máximo de auxinas con la línea reportera *DR5:GUS*. **d)** Fotografías representativas del patrón morfológico durante la formación de los PRL (Peret *et al.*, 2009).

Como se mencionó anteriormente, el desarrollo de las RL, ocurre a partir de células del periciclo de la RP y es regulado por las auxinas mediante diferentes módulos de señalización. Las auxinas al ser reconocidas por sus receptores nucleares Transport Inhibitor Response (TIR, por sus siglas en inglés)/Auxin Signaling F-Box (AFB, por sus siglas en inglés), promueven la unión de éste con diferentes represores AUX/IAA. Posteriormente, TIR1 que forma parte del complejo SCF^{TIR1/AFB} desencadena la ubiquitinización de los represores AUX/IAA en el proteosoma 26S, liberando de esta manera a los factores de transcripción de respuesta a auxinas (ARF, por sus siglas en inglés) y promoviendo así la expresión de los genes de respuesta a auxinas (Fig. 7) (Schaller *et al.*, 2015).

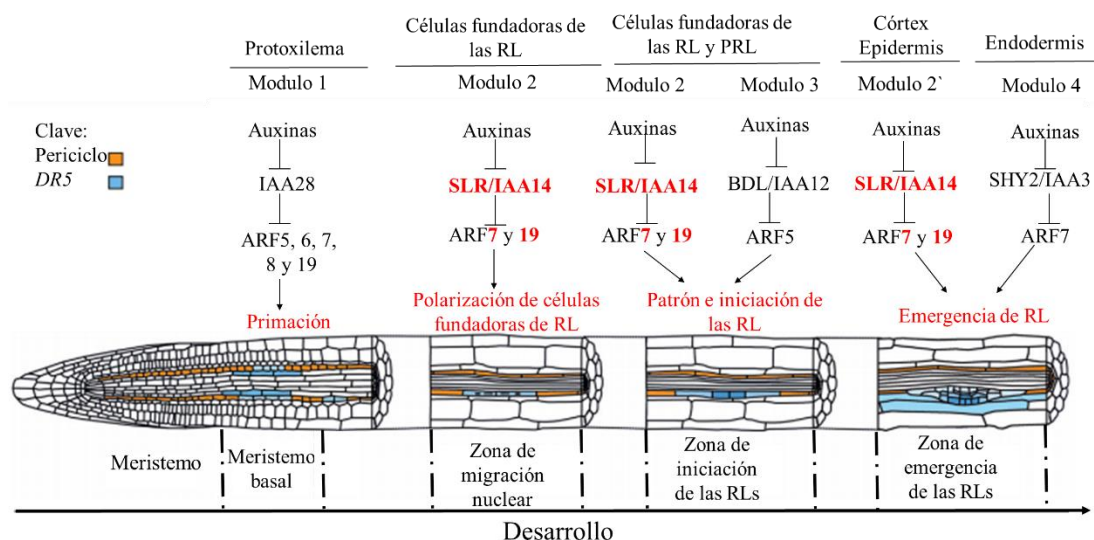


Figura 7. Las auxinas controlan el desarrollo de las RL a través de múltiples módulos de señalización.

En el módulo 1, en el protóxilema las auxinas promueven la degradación del represor IAA28 y la liberación de los factores ARF 5, 6, 7, 8 y 19 implicados en la primación, donde las células fundadoras del periciclo son marcadas en el meristemo basal. En el 2, a través de las auxinas SOLITARY ROOT (SLR)/ Indol-3 Acetic Acid 14 (IAA14) es degradado y entonces se liberan a los factores ARF7 y 19, los cuales estimulan la migración nuclear en el par de células fundadoras de las RL. En el módulo 3, las auxinas promueven la degradación de BODENLOS (BDL)/IAA12 y se libera al ARF5, el cual junto con los ARF7 y 19 liberados en el módulo 2 inducen el patrón y la iniciación de las RL. Mientras que en el 4, a través de la vía de las auxinas se degrada a SHORT HIPOCOTYL 2 (SHY2)/IAA3 con la consecuente liberación del factor ARF7 que junto con los ARF7 y 19 liberados en el módulo 2 promueven la emergencia de las RL rompiendo la epidermis (Lavenus *et al.*, 2013).

2.3.4 Regulación del crecimiento y desarrollo vegetal por las auxinas

Las plantas coordinan su crecimiento (proliferación o elongación celular) y desarrollo a nivel de tejidos y órganos mediante moléculas de señalización que les permiten una comunicación extracelular. Tal es el caso de las auxinas, el nombre deriva de la palabra griega *auxen* que significa crecer, estas son uno de los reguladores del crecimiento vegetal que participan en la reproducción, embriogénesis, elongación del hipocotilo, formación de raíces laterales y pelos radicales, además regulan procesos diversos como las respuestas trópicas a la luz y gravedad (Vanneste y Friml, 2009).

La vía de respuesta a las auxinas está regulada a diferentes niveles: i) biosíntesis, conjugación (la unión de el AIA a Ala, Leu y Glu) y degradación; ii) el transporte direccional que involucra al PAT mediante los transportadores de entrada (influjo) y salida (eflujo) que generan un gradiente en los tejidos. El primero se lleva a cabo por las AUX1/IAA, mientras que el segundo por los PIN y ABCB localizados en la membrana plasmática y iii) finalmente su percepción y señalización se da a través de la regulación transcripcional (Fig. 8) (Robert y Friml, 2009; Schaller *et al.*, 2015). Las auxinas son detectadas por el receptor nuclear TIR1 que forma parte del complejo SKP1-Cull-F-box (SCF) localizado en el núcleo. Cuando la concentración de auxinas celular está por debajo de cierto umbral, la respuesta es inhibida por una familia de represores AUX/IAA que

secuestran a los ARF requeridos para la transcripción de genes de respuesta a auxinas. Mientras que en altas concentraciones, la unión de la auxina a su receptor facilita la ubiquitinización del represor, su degradación y la liberación de los ARF (Schaller *et al.*, 2015).

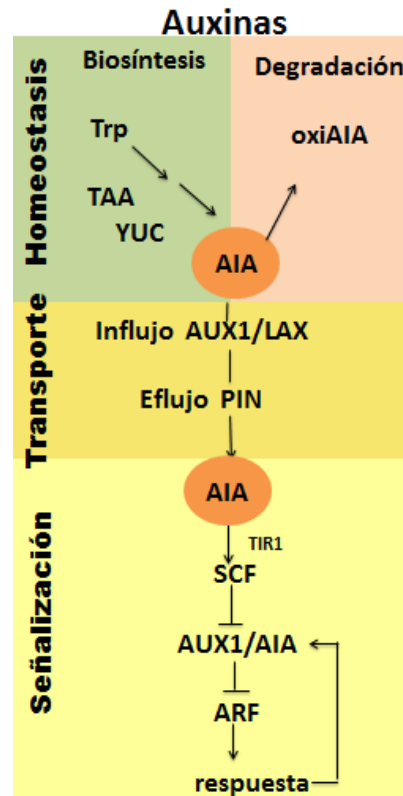


Figura 8. Vía de respuesta a las auxinas. Se muestran los elementos moleculares involucrados en la biosíntesis, degradación, transporte y señalización de las auxinas. La homeostasis celular de la fitohormona es regulada por su biosíntesis, conjugación y catabolismo (Modificado de Schaller *et al.*, 2015).

Las auxinas son sintetizadas en diferentes partes de la planta, pero la mayor cantidad se produce en los tejidos jóvenes como el meristemo de las hojas y en menor cantidad en el meristemo de la raíz primaria. Desde los sitios de síntesis, las auxinas son redistribuidas hacia toda la planta donde son requeridas para la división y elongación celular, la formación de RL y la dominancia apical entre otros procesos.

2.3.5 Homeostasis de las auxinas

Este proceso es el resultado de ajustes múltiples y dinámicos en los mecanismos de regulación, con la finalidad de mantener un equilibrio interno relativamente estable que permite el crecimiento y el desarrollo favorable de las plantas, así como su adaptación a una amplia gama de estímulos ambientales. Los mecanismos que controlan dicha homeostasis implican la biosíntesis, conjugación, catabolismo, la compartimentación celular y el transporte de auxinas (Wang e Irving, 2011).

En el catabolismo el exceso del AIA se degrada mediante la acción de las peroxidasas. Respecto a la biosíntesis se ha reportado que el AIA es sintetizado por dos rutas:

dependiente o independiente del triptofano (Trp). En la primera después de la síntesis del precursor Trp, ésta se divide en cuatro vías distintas que se denominan de acuerdo a su molécula intermediaria: indolacetamida (IAM), ácido indol-3-pirúvico (IPA), triptamina (TAM) e indol-3-acetaldoxima (IAOx) (Fig. 9). En la vía independiente del Trp, el antranilato es el precursor para la formación del AIA.

La principal vía de síntesis del AIA en *Arabidopsis* es a través de la vía IPA, donde el Trp inicialmente es convertido por la Trp Aminotransferasa (AT) a IPA, el cual posteriormente es oxidado y transformado al AIA por las proteínas YUCCA (YUC), una clase de flavin mono-oxigenasas. Algunos estudios genéticos de las YUCCA han indicado que la síntesis del AIA por estas enzimas tiene funciones esenciales en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Sin embargo, la función de la síntesis del AIA por esta vía en eventos fisiológicos vegetales es muy difícil de analizar, porque mutantes múltiples de estos genes son letales o causan serios defectos durante el desarrollo. Así que como alternativa, se ha inhibido la síntesis del AIA, con el uso del ácido amino-oxifenilpropionico que inhibe a la enzima piridoxal y/o aminotransferasa y por tanto la actividad de TAA. También la L-Kinurina (Kyn), un análogo del Trp, fue identificada como un potente inhibidor competitivo de las enzimas TAA/TARs en *Arabidopsis*.

Nishimura *et al.*, (2013), demostraron que el compuesto 5-(4-clorofenil)-4H-1,2,4-triazol-3-tiol, designado como yucasina, es un inhibidor de la biosíntesis del AIA que tiene como blanco a las enzimas YUCCA. En un sistema de coleótilos de maíz, este compuesto fue identificado como el más potente inhibidor de la biosíntesis del AIA.

Por otro lado, las auxinas sintetizadas son transportadas a tejidos específicos donde activan cascadas de señalización que causan la respuesta del desarrollo (Benjamins y Scheres, 2008). Las auxinas sintetizadas en el follaje son transportadas a través de proteínas acarreadoras hacia la raíz, permitiendo la formación de un gradiente de auxinas con mayor acumulación en la parte proximal al tallo. Esta acumulación diferencial de auxinas causa una redistribución posterior hacia la zona de elongación celular y diferenciación de la raíz, donde es esencial para distintos procesos morfogénicos (Rashotte *et al.*, 2000; Casimiro *et al.*, 2001).

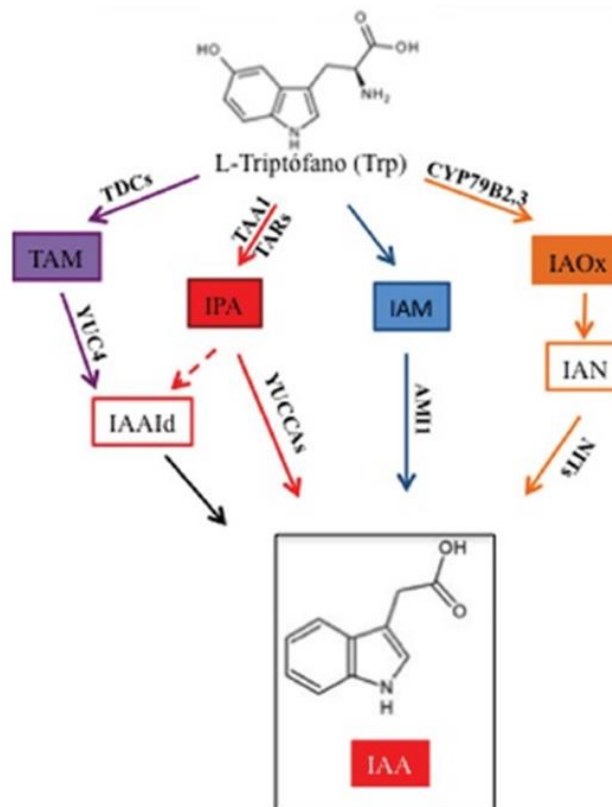


Figura 9. Vías de síntesis del AIA. Se muestran las vías dependientes del triptófano: en azul la vía IAM donde participan las hidrolasas AMI1 que lo convierten al IAA. En naranja se esquematiza la vía IAox, aquí participan las citocromos monooxigenasas CYP79B2 y 3 para convertir el Trp en IAox, y se ha sugerido que las nitrinas (NITs) transforman el Indol-3-AcetoNitrilo (IAN) en AIA. En rojo se presenta la vía IPA, donde la triptófano aminotransferasa y las enzimas relacionadas 1 y 2 (TAA1 y TAR1 y 2) transforman el Trp en IPA, que a su vez es convertido al IAA por las YUCCA (Won *et al.*, 2011). En morado se presenta la vía TAM, donde se sugiere que las triptófano descarboxilasas (TDC) transforman el Trp en TAM, el cual es convertido a Indol 3-AcetAldehido (IAAd) mediante la acción de YUCCA4 para generar al AIA (Korasick *et al.*, 2013).

2.3.6 Transporte polar de las auxinas

Las auxinas desde los sitios de síntesis son distribuidas a los distintos órganos de la planta por dos tipos de transporte; uno rápido y no direccional donde el floema moviliza a las auxinas hacia los tejidos demandantes. El otro tipo de transporte es direccional, se efectúa célula a célula con la ayuda de proteínas acarreadoras de influjo y eflujo (Robert y Friml, 2009) y este se conoce como el transporte polar de auxinas (PAT, por sus siglas en inglés) que se basa en la teoría quimiosmótica. Esta teoría propone que al ser el AIA un ácido débil con un pKa de 4.75 permite a la planta adquirirlo en dos formas químicas dependiendo del pH del ambiente: en la forma protonada (AIAH) a pH ácido y en la forma anionica (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 en el citosol, cuyo pH es de 7, se favorece la estructura anionica AIA⁻ que no puede ser transportada a través de la membrana hacia las células vecinas, así que su transporte requiere tanto de proteínas acarreadoras de influjo como de eflujo (Fig. 10) (Robert y Friml, 2009).

Los acarreadores PIN-FORMED (PIN) son una familia de proteínas transmembrales específicas de plantas que está constituida por ocho miembros, los cuales son divididos en dos subfamilias con base a la presencia o ausencia de un dominio hidrofílico central: i) Las PIN de dominio grande incluye todos los miembros definidos como transportadores de eflujo de auxinas localizados en la membrana plasmática: PIN1, PIN4, PIN6 y PIN7. ii) La subfamilia PIN de dominios cortos, son proteínas con el dominio hidrofílico central ausente y comprende a los PIN5 y PIN8, que parecen estar localizados en el retículo endoplasmático, y por lo tanto no están directamente involucrados en el transporte de auxinas entre células, pero si median la homeostasis intracelular de las auxinas (Fig. 11 a-b) (Zhou y Lou, 2018).

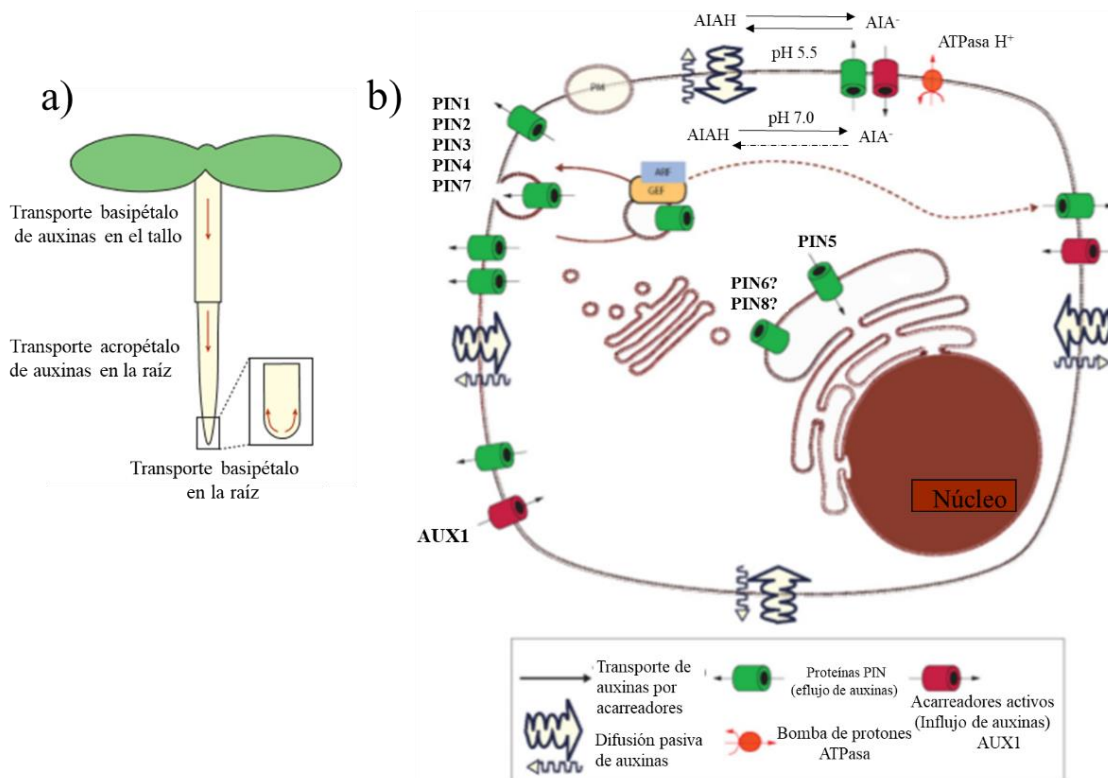


Figura 10. Transporte de las auxinas. a) Distribución de las auxinas a través del floema desde las hojas jóvenes y los brotes florales hacia el ápice radicular. b) Las auxinas protonadas AIAH puede difundir a través de la membrana plasmática, mientras que el AIA⁻ es transportado dentro de la célula por los acarreadores de influjo AUX1. En el citosol, el AIAH es disociado a AIA⁻ y por lo tanto queda atrapado dentro de la celula y puede salir solamente a través de los transportadores de eflujo: P-glicoproteínas (PGP) y PIN-FORMED (PIN). La localización de los transportadores determina la direccionalidad del flujo intracelular de auxinas (Robert y Friml, 2009).

PIN8 se expresa específicamente en el gametofito masculino (Ding *et al.*, 2012) y junto a PIN5 median el transporte intracelular de auxinas en el polen (Dal Bosco *et al.*, 2012). En *Arabidopsis*, PIN1 media la organogénesis y la diferenciación del tejido vascular, PIN2 el crecimiento gravitrópico de la raíz, PIN3 el crecimiento diferencial del follaje, PIN4 la actividad del meristemo de la raíz y PIN6 modifica el transporte de auxinas en procesos dependientes de la alteración de auxinas, especialmente aquellos requeridos para

el crecimiento de la raíz y el desarrollo reproductivo (Cazzonelli *et al.*, 2013). PIN7 está involucrado en el desarrollo temprano del embrión (Vienet *et al.*, 2005).

En la raíz primaria de *A. thaliana*, las auxinas que llegan a través del floema son redistribuidas por las diferentes proteínas PIN, estableciendo un gradiente de esta hormona. PIN1 participa en el movimiento de auxina hacia abajo en la parte central de la raíz, PIN2 establece un flujo hacia arriba en las regiones laterales, PIN3 y PIN7 redistribuyen la auxina en la región de la columela y PIN4 mueve a las auxinas hacia el QC (Fig. 11c) (Michniewicz *et al.*, 2007), mientras que PIN1 y PIN3 están involucradas desde la primación hasta el crecimiento de las RL (Fig. 11d) (Finet y Jaillais, 2012).

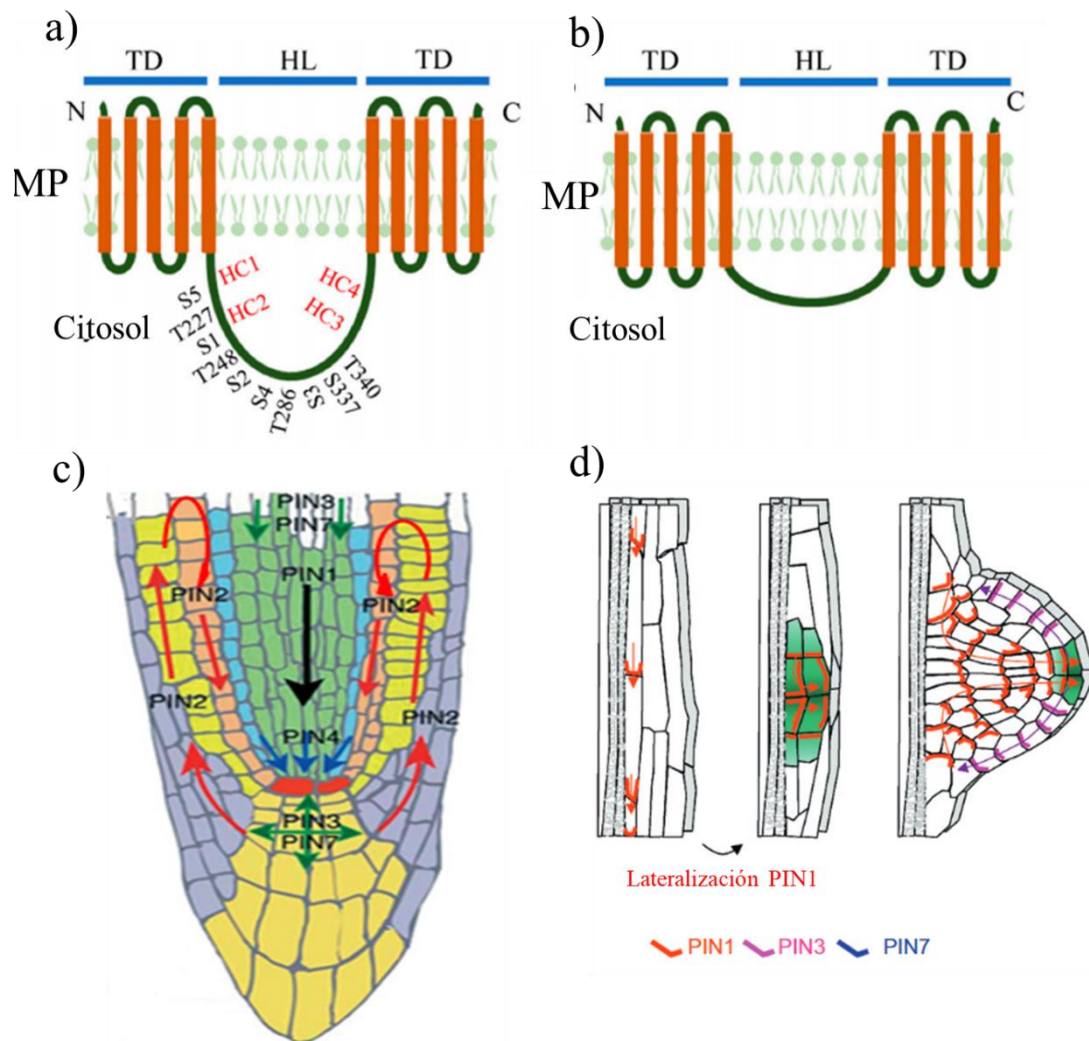


Figura 11. Estructura molecular y posicionamiento de las PIN. Las proteínas PIN albergan un típico bucle hidrofílico largo central (HL) entre los extremos amino y carboxi-terminales con cinco dominios transmembranales (TD) que se extienden en la membrana plasmática (MP). **a)** Proteínas PIN largas (PIN 1-5, 6 y 8). **b)** PIN cortas (PIN 5 y 8) (Zhou y Lou, 2018). **c)** La localización polar de las proteínas PIN es clave para el flujo de auxinas y el establecimiento local de la concentración máxima de auxinas en la punta de la raíz. **d)** Los transportadores que participan principalmente en la formación de las RL son PIN1, PIN3 y PIN7 (Finet y Jaillais, 2012).

Otros acarreadores de eflujo de las auxinas, son los llamados ABCB que pertenecen a la familia multigénica de proteínas que poseen una región de unión al ATP [ATP-Binding Cassette (ABC)], conocidas también como proteínas multi-resistentes a drogas o glicoproteínas P (MDR/PGP) (Bailly *et al.*, 2008). Estos transportadores (ABCB/MDR/PGP) que incluyen veintiún miembros, no se localizan polarmente en la membrana plasmática sino de forma lateral (Cho y Cho, 2013). Dichos transportadores originalmente fueron identificados como moléculas que participan en procesos de detoxificación (Martinoia *et al.*, 1993) y a partir de entonces se ha demostrado que están involucrados en las respuestas a patógenos, la acumulación de fitatos en las semillas y en la interacción con el ABA. Algunas de estas proteínas co-localizan con los PIN incrementando la especificidad y el transporte de auxinas (Martinoia *et al.*, 1993). Mientras que otros miembros de esta clase de transportadores funcionan para mantener el flujo de larga distancia y el movimiento de las auxinas hacia afuera de los tejidos apicales (Vieten *et al.*, 2005). Adicionalmente, estos transportadores participan en el crecimiento de órganos, la nutrición de las plantas, el desarrollo vegetal, la respuesta a estrés abiótico y la interacción de las plantas con su ambiente (Kang *et al.*, 2011).

2.3.7 Red de respuesta a las auxinas

Las auxinas son percibidas por los receptores nucleares TIR/AFB; en presencia de bajas concentraciones de este fitoregulador los represores Aux/IAA se unen a los factores de transcripción ARF bloqueando su función, mientras que en exceso de la fitohormona, los Aux/IAA forman un complejo con TIR1/AFB, lo que promueve su ubiquitinización y subsecuente degradación en el proteosoma 26S, liberando así a los ARF (Fig. 12).

Los ARF modulan la expresión en minutos de diversos genes inducidos por las auxinas, los cuales se clasifican en tres familias: *SAUR*, *GH3* y *Aux/IAA*. Los SAUR fueron descubiertos desde 1987, no obstante su función había permanecido sin dilucidar. A la fecha, en *Arabidopsis thaliana* se han reportado 82 miembros, los cuales se localizan en la membrana y/o el citoplasma y se acumulan a los 2.5 min posteriores al tratamiento con auxinas, inhibiendo a la fosfatasa PP2C.D y activando a la ATPasa H⁺ en la membrana plasmática y de esta manera promueven la expansión celular polar (Ren y Gray, 2015), además de influir negativamente en la síntesis de auxinas y de sus acarreadores (Kant *et al.*, 2009).

Mientras que los 19 miembros de GH3 están involucrados principalmente en la homeostasis por medio de la conjugación del IAA con aminoácidos y su posterior degradación.

Finalmente, los Aux/IAA son casi todos regulados positivamente por esta fitohormona y participan en la respuesta intracelular de las auxinas (Sauer *et al.*, 2013). Además del sistema de percepción de auxinas y su control transcripcional, se conoce otro mecanismo no transcripcional controlado por la proteína AUXIN BINDING PROTEIN (ABP1, por sus siglas en inglés), la cual se localiza en el retículo endoplasmático y actúa

principalmente en la elongación y la división celular (Hayashi, 2012; Schaller *et al.*, 2015; Strader y Zhao, 2016).

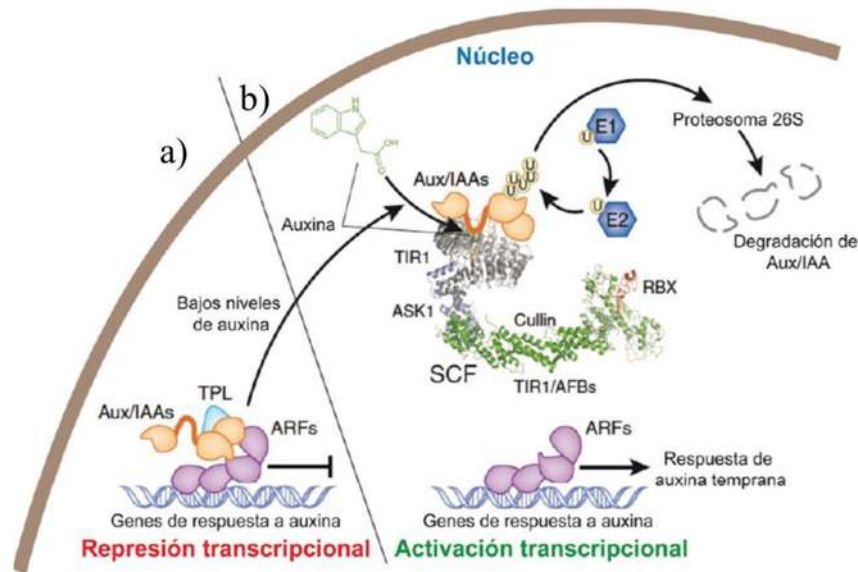


Figura 12. Modelo de la señalización por auxinas. TIR1 es una proteína tipo F-Box que se une directamente a las auxinas y activa la degradación de los represores Aux/IAA. **a)** A bajos niveles de auxinas la transcripción dependiente de los ARFs es reprimida por Aux/IAA y el co-represor TOPLESS (TPL, por sus siglas en inglés). **b)** Altos niveles de auxinas permiten la formación del complejo TIR1-Aux/IAA y la ubiquitinación de Aux/IAA y su subsecuente degradación, liberando así a las proteínas ARF que activan transcripcionalmente a los genes de respuesta temprana a las auxinas en las plantas (Modificado de Santner y Estelle, 2009).

2.3.8 Citocininas

Las citocininas regulan múltiples procesos de crecimiento y desarrollo, división celular, germinación, actividad meristemática, inmunidad, metabolismo primario y secundario, diferenciación del xilema, desarrollo de la vasculatura, de los gametofitos y cloroplastos. Además, controlan el desarrollo del SAM, la dominancia apical, la movilización de nutrientes, las relaciones entre los nutrientes y la fuente de estos y el retraso de la senescencia. Los síntomas de la enfermedad como agallas, tumores, manchas y nudos se asocian con altos niveles de CK (Spallek *et al.*, 2018). Las CK son abundantes en la punta de la raíz primaria y en las semillas inmaduras.

El primer paso para su síntesis es catalizado por la isopenteniltransferasa (IPT) y consiste en la adición de un prenilo de dimetilalil difosfato al ADP/ATP para producir el ribosido N⁶-isopenteniladenina (iP). Los iP pueden convertirse en CK tipo *trans*-zeatina (tZ) mediante la hidroxilación de la cadena isoprenoide por la citocromo P₄₅₀ (CYP735A). Las formas activas de estos fitoreguladores son los ribosidos de citocininas, los cuales se obtienen a través de un solo paso catalizado por una familia de nucleósido 5'-monofosfato fosfotransferasas LONEY GUY (LOG) (Fig. 13a). Sin embargo, iPRTP, iPRDP y los nucleótidos tZ correspondientes se desfosforilan mediante fosfatasa, iPRMP y tZRMP pueden convertirse directamente en bases libres activas mediante la LOG. Las *cis*-zeatina (cZ), que en algunas especies de plantas son los principales metabolitos de las CK, se

sintetizan en *Arabidopsis* exclusivamente por la tRNA-IPT que utiliza el tRNA como aceptor del grupo prenilo.

Los niveles de las CK pueden ser reducidos a través de su conjugación con glucosa, dichas moléculas son inactivas y no pueden unirse con los receptores, o por enzimas amino oxidasas dependientes de cobre que rompen la cadena lateral N₆, inactivándolas irreversiblemente.

Las CK son sintetizadas en la raíz y después son transportadas hacia el brote, a través del xilema como *tZ*-ribosidos, donde tienen funciones importantes en la regulación del PAT y en el mantenimiento de los patrones vasculares.

Allen *et al.* (1953), mostraron que la aplicación exógena de un inhibidor del PAT puede inducir la formación de estructuras parecidas a nódulos en raíz de alfalfa en ausencia de *Rhizobium*. A la fecha se ha propuesto que el transportador ATP-BINDING CASSETE (ABC) exporta a las CK desde su sitio de biosíntesis en la raíz hacia el xilema y que la PURINE PERMEASE (PUP) las importa dentro de la célula para iniciar la cascada de señalización esta fitohormona.

Las plantas perciben y responden a las CK a través de dos pasos de fosfotransferencia, en *A. thaliana* se han identificado a las proteínas histidina cinasas transmembranales: ARABIDOPSIS HIS KINASE 2 (AHK2), AHK3 y AHK4/WOL1 (WOODENLEG1)/CRE1 (CYTOKININ RESPONSE1) que actúan como receptores de las CK. Una vez que las CK se unen, los receptores se autofosforilan induciendo cambios conformacionales que desencadenan la fosfotransferencia de un grupo fosforilo (P) que se transfiere primero de una His (H) conservada, a un residuo de Asp (D) dentro del receptor y luego a los miembros de la familia ARABIDOPSIS HIS PHOSPHOTRANSFER PROTEIN (AHP).

Las AHP se tranlocan continuamente entre el citosol y el núcleo, donde fosforilan a las proteínas ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS (ARR) tipo A y B, donde solo estos últimos actúan como factores de transcripción. Los ARR tipo B fosforilados pueden unirse al DNA e iniciar la transcripción de genes de respuesta a las CK, incluidas las ARR tipo A, que actúan como inhibidores de la señalización (Fig. 13b)(Kieber y Schaller, 2018).

2.3.10 El crecimiento de la raíz primaria dependiente de las auxinas y citocininas

Las plantas coordinan su crecimiento y desarrollo a nivel de tejidos y órganos mediante la emisión de moléculas de señalización extracelulares que les permite la comunicación entre las células (Chow y McCourt, 2006). En consecuencia, las hormonas vegetales debido a su característica principal de estimular programas de organogénesis, controlan cada aspecto del ciclo de vida de las plantas (Gray *et al.*, 1998). Entre las fitohormonas que modulan el crecimiento y desarrollo destacan las auxinas, principalmente el AIA y las CK, ambas como vimos anteriormente están involucradas en el crecimiento de la RP en forma antagonica (Chapman y Estelle, 2009). Las CK a través de los factores de transcripción ARR1 tipo B entre otros, promueven la expresión del represor IAA/SHY2 el cual regula negativamente el transporte de auxinas al bloquear la expresión de los transportadores de eflujo PIN, evitando así el transporte de auxinas en la zona de diferenciación. Por el contrario, las auxinas bloquean la síntesis del represor IAA3/SHY2 promoviendo su degradación y la posterior expresión de los transportadores PIN que movilizan a las auxinas hacia el meristemo de la raíz primaria formando así, un máximo de auxinas en el QC, el cual es requerido para mantener la morfología del SCN (Fig.15).

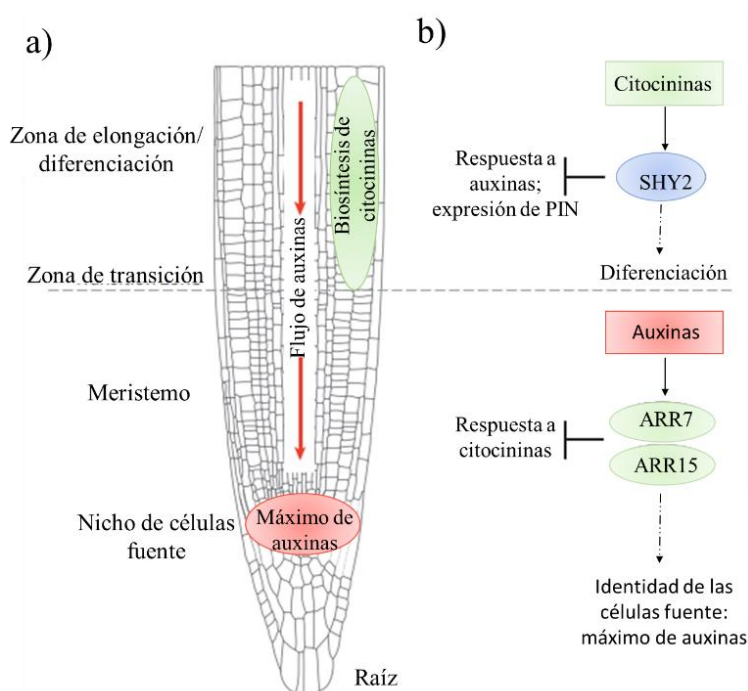


Figura 15. Cruce de señales entre las citocininas y las auxinas controla el tamaño del meristemo de la raíz en *Arabidopsis*. a) La raíz requiere un máximo de auxina en el SCN para la formación del meristemo. Los genes de la biosíntesis de CK se expresan en la zona de elongación-diferenciación, donde las células de meristemo se diferencian y comienzan a alargarse. b) En el meristemo, la respuesta de las CK es reprimida por la expresión de los represores ARR7 y ARR15, efecto necesario para el mantenimiento de la identidad de meristemo. En la zona de elongación-diferenciación, la respuesta de las auxinas y su redistribución son reprimidas por la expresión de SHY2 y de PIN mediada por las CK. El tamaño del meristemo se controla a través del efecto de las auxinas y de las CK en las zona meristemática y de diferenciación de la raíz y por el antagonismo entre las dos hormonas (Chapman y Estelle, 2009).

2.4 Características de la cinasa TOR en mamíferos

El crecimiento de los organismos vivos no es una simple suma de energía y nutrientes disponibles, sino que es un proceso que utiliza estrategias complejas de supervivencia y reproducción. En metazoarios, mamíferos y plantas, el elemento clave de esta regulación es el blanco de rapamicina (TOR, por sus siglas en inglés), proteína con un peso de 250 kDa que pertenece a la familia de las cinasas serina/treonina conocidas como Phosphatidyl Inositol 3-Kinase-related Kinases(PIKKs, por sus siglas en inglés).

El conocimiento de TOR se remonta a mediados de los 70's con la caracterización de la rapamicina, compuesto secretado por *Streptomyces hyfrosopicus*, una bacteria del suelo aislada de la isla de Pascua. La rapamicina, es un macrólido que primero se distinguió como un agente antifúngico pero luego como un potente inmunosupresor e inhibidor del crecimiento a través de su interacción con TOR (Engelman *et al.*, 2006).

La proteína TOR presenta los siguientes dominios: repeticiones Huntington, Elongation factor 3 regulatory, subunit A of PP2A, TOR1 (HEAT, por sus siglas en inglés), FRAP-ATM-TTRAP (FAT, por sus siglas en inglés) y FKBP-Rapamycin-Binding (FRB, por sus siglas en inglés).

TOR forma parte de dos complejos proteicos distintos: TORC1 (mTOR, Raptor y LST8) y TORC2 (Rictor, SIN1 y LST8)(Fig. 16a). El primero, es parte de la ruta sensible a nutrientes que interviene principalmente en la regulación de la síntesis de proteínas y crecimiento celular, mientras que TORC2 es activado por factores de crecimiento y así regula el rearrreglo del citoesqueleto.

Es importante señalar que TORC1 es el complejo sensible a la rapamicina (van Dam *et al.*, 2011; Beauchamp y Platanias, 2013; Henriques *et al.*, 2014). A la fecha, la estructura 3D de TORC1 obtenida mediante microscopía crio-electrónica de alta resolución (Yip *et al.*, 2010; Aylett *et al.*, 2016) sugiere que dos de estos complejos se dimerizan para formar una estructura hueca en forma de rombo donde la Regulatory-Associated Protein of TOR (RAPTOR) y mammalian Lethal with Sec13 protein8 (mLST8) constituyen la parte periférica del complejo en el eje largo y corto respectivamente (Fig. 16b).

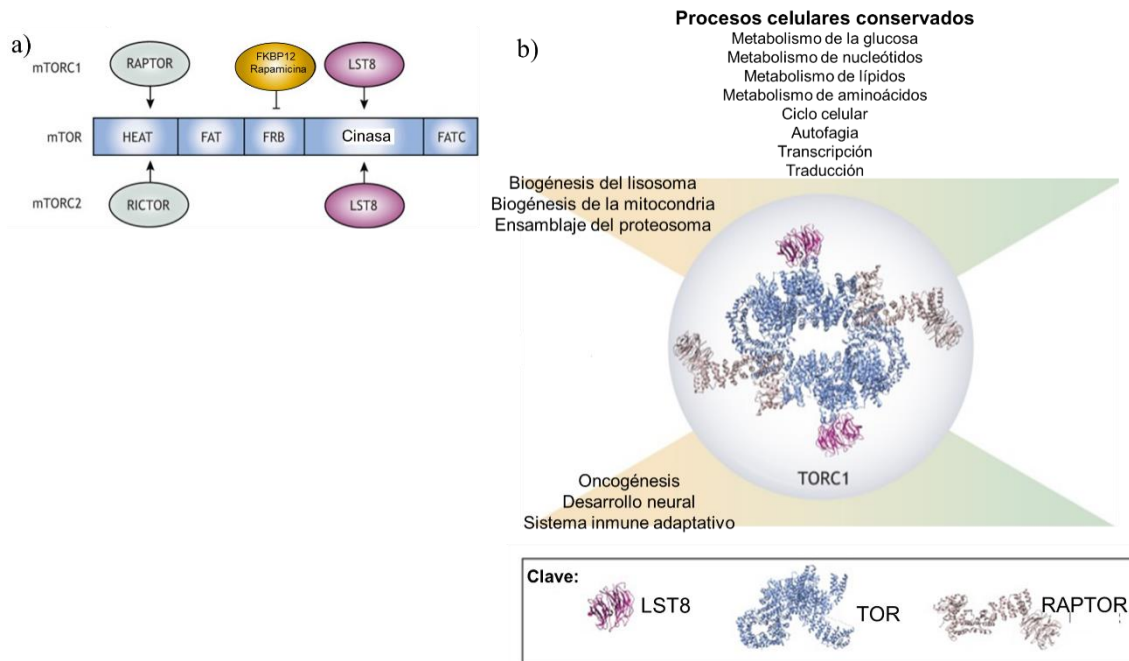


Figura 16. La estructura de TOR y sus complejos. a) La estructura de TOR, destacando los componentes de los complejos TORC1 y TORC2 que se unen a sus dominios respectivos. b) Se muestra al complejo TORC1 dimerizado y los diferentes procesos que regula (Shi *et al.*, 2018).

2.4.1 Ruta de transducción de señales PI3K/TOR/S6K en mamíferos

En mamíferos, la insulina al unirse al receptor de insulina (IR, por sus siglas en inglés), induce la autofosforilación de éste y la fosforilación del sustrato receptor de insulina (IRS, por sus siglas en inglés) el cual, se convierte en el sitio de unión y activación de proteínas con dominios homología al dominio 2 de proteínas Scr (SH2, por sus siglas en inglés), como la Phosphatidyl Inositol 3-Kinase (PI3K, por sus siglas en inglés).

PI3K fosforila a los lípidos de membrana Phosphatidyl Inositol 4,5 biphosphate (PIP2, por sus siglas en inglés) transformándolos a Phosphatidyl Inositol 3,4,5-triphosphate (PIP3, por sus siglas en inglés). Un aumento de PIP3 en la membrana plasmática es una señal para reclutar a la Phosphoinositide-Dependent Kinase (PDK1, por sus siglas en inglés) y a la Protein Kinase B (Akt/PKB).

Una vez que Akt se activa, fosforila al complejo Tuberose Sclerosis Complex (TSC1/TSC2, por sus siglas en inglés), atenuando su interacción y permitiendo así su desacoplamiento (Olivares Reyes y Arellano Plancarte, 2008; Jastrzebski *et al.*, 2011). Este desacoplamiento permite la activación de la GTPasa Rheb, pasando de un estado inactivo Rheb/GDP al activo Rheb/GTP. De esta manera, Rheb/GTP interacciona con la cinasa mTOR y la activa.

Por lo antes mencionado, mTOR es considerada un blanco directo de la ruta de señalización PI3K/Akt. Una vez activada, mTOR fosforila a sus dos blancos: 1) Protein S6 Kinase S6 (S6K, por sus siglas en inglés) y 2) Eukaryotic translation Initiation Factor-Binding Protein 1 (4EBP1, por sus siglas en inglés) que libera al factor de inicio de la

traducción eIF4E del complejo inactivo eIF4E/4EBP1, permitiendo con ello que eIF4E forme parte del complejo de iniciación de la traducción. eIF4E se une a la estructura Cap (m⁷GpppN) del extremo 5' de los mRNAs y es el factor limitante del inicio de la traducción (Gingras et al., 1999) (Fig. 17).

S6K a su vez fosforila a la proteína S6 y los ribosomas fosforilados en dicha proteína reclutan a transcritos específicos que presentan trectos de oligopirimidinas (TOP) en el extremo 5' UTR a polisomas, como son los que codifican para proteínas ribosomales y factores de elongación (Schepetilnikov *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2018).

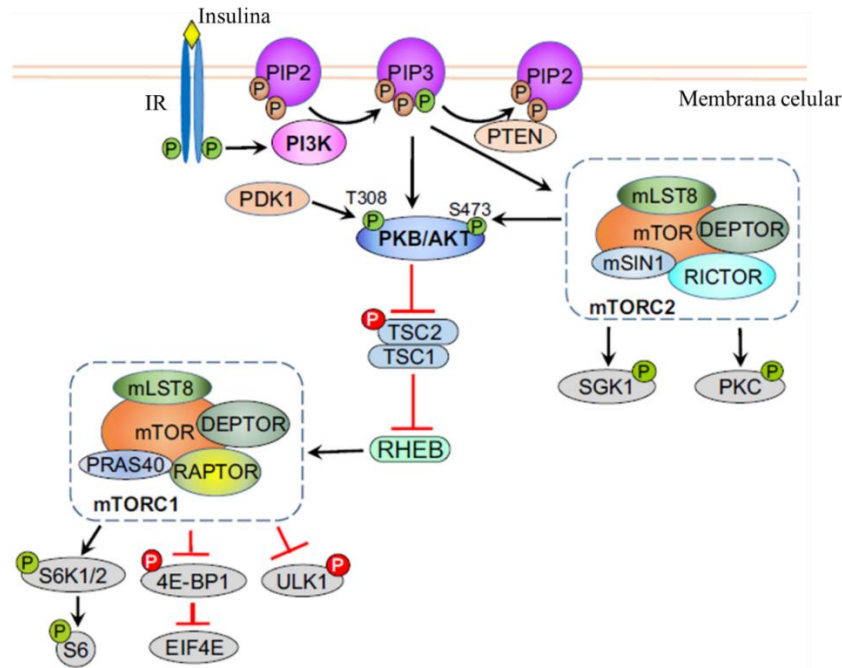


Figura 17. Cascada de señalización PI3K/AKT/mTOR y sus principales efectores río abajo. Tras la estimulación de la insulina, PI3K activa fosforila al PIP2 y produce PIP3, el cual recluta a PDK1 que fosforila en T308 a PKB/AKT, y mTORC2 en S473 respectivamente. La AKT fosforila y desacopla al complejo TSC1/2 que entonces activa a RHEB, lo que posteriormente permite la activación de mTORC1 en la superficie de lisosoma, iniciando su actividad en varias proteínas río abajo incluyendo a S6K, 4E-BP1 y ULK1. mTORC2 activo puede regular varias AGC cinasas, como SGK1 y PKC (Jason y Wei, 2016).

En mamíferos, TOR es parte central de una red de transducción de señales que controla el metabolismo, crecimiento y división celular en respuesta a diversos estímulos incluyendo nutrientes, energía, estrés, hormonas y mitógenos (Gao *et al.*, 2002; Inoki *et al.*, 2003; Brugarolas *et al.*, 2004; Wullschleger *et al.*, 2006; Russell *et al.*, 2011; Zoncu *et al.*, 2011).

2.4.2 Vía de transducción de señales de TOR en plantas

Se han reportado proteínas homólogas en plantas de algunos de los componentes de la vía de señalización PI3K/TOR/S6K en mamíferos como: PI3K, PDK, TOR, LST8, RAPTOR, S6K y AMP-activated protein Kinase (AMPK, por sus siglas en inglés) (Rexin *et al.*, 2015).

En *Arabidopsis thaliana*, la proteína homóloga a PI3K está codificada por *Vacuolar Protein Sorting 34* (*AtVPS34*, por sus siglas en inglés), la cual es activada por factores de crecimiento y es esencial para el crecimiento (Welters *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2010). También *AtVPS34*, ha sido implicada en varios eventos fisiológicos como: el gravitropismo inducido por las auxinas, respuesta al estrés salino en raíces, cierre de estomas inducido por el ABA, la reorganización de la actina y el crecimiento de los pelos radiculares (Lee *et al.*, 2010).

TOR también es activada por el ácido fosfatídico (PA, por sus siglas en inglés), el cual se origina a partir de la ruptura de la colina membranal, mediante la fosfolipasa D (PLD, por sus siglas en inglés); *Arabidopsis* contiene al menos doce PLDs. El análisis funcional de la supresión de *PLDa1* en *Arabidopsis*, mostró una disminución en la acumulación del JA (Wang, 2002), en la generación de especies reactivas de oxígeno (Sang *et al.*, 2001), una mayor tolerancia a la congelación (Welti *et al.*, 2002) e hipersensibilidad a la glucosa vía la activación de TOR mediada por PA (Hong *et al.*, 2008).

Río abajo de *AtVPS34*, se localiza la cinasa *AtPDK1*, la cual participa en un gran número de procesos fisiológicos, incluyendo el crecimiento, la proliferación celular (Otterhag, 2006) y la fosforilación de la cinasa *AtS6K* (Mahfouz *et al.*, 2006).

Otro componente de la vía, es la SNF1-Related Kinase 1 (SnRK1, por sus siglas en inglés), proteína cinasa sensor de la glucosa/energía, la cual es el ortólogo vegetal de la AMPK de mamíferos (Fig. 18).

La señalización TOR-SnRK1, tiene una función central y antagonista que impacta el crecimiento vegetal desde las primeras etapas del desarrollo. Cuando la célula se encuentra en condiciones favorables de energía y nutrientes, TOR activa el anabolismo y SnRK1 esta inactiva. Al disminuir los niveles energéticos, SnRK1 se activa fosforila a RAPTOR1B y así inhibe la actividad de TOR. Análisis fosfoproteómicos globales en plantas de sobre expresión y mutantes de SnRK1 de *Arabidopsis* revelaron una alteración en los niveles de fosforilación de RPS6 y del factor de transcripción E2F. Así, el comportamiento de TOR y SnRK1 permitió sugerir el modelo del “yin-yang”; aunque bajo ciertas circunstancias fisiológicas, dichas cinasas pueden actuar en diferente forma (Rodríguez *et al.*, 2019).

SnRK1 está formada por una subunidad catalítica (α) y dos reguladoras (β , γ), existen en *Arabidopsis*, tres isoformas de la subunidad catalítica: KIN10, KIN11 y KIN12, pero solo KIN10 y KIN11 parecen expresarse (Jossier *et al.*, 2009). KIN10 es responsable de la mayor parte de la actividad SnRK1 y bajo condiciones de privación de energía y estrés, esta proteína interactúa y fosforila a RAPTOR.

En *Arabidopsis*, la sobreexpresión de *KIN10* resulta en una floración tardía, mientras que la de *KIN11* provoca una floración temprana. También el complejo SnRK1 puede activar a los factores de transcripción bZIP2, bZIP11 y bZIP63 en respuesta a la inanición, lo que a su vez conduce a una regulación positiva de la expresión de genes de varias vías catabólicas como la autofagia y las vías de degradación de los componentes de la pared celular, del almidón, aminoácidos, sacarosa, lípidos y proteínas, proporcionando con ello fuentes alternativas de energía y metabolitos. Lo antes mencionado, sugiere que SnRK1 regula el metabolismo global de las plantas, el crecimiento y el balance energético (Soto y Bassham, 2017).

El blanco más estudiado de TOR es la cinasa S6K, de la cual en *Arabidopsis* se reportaron *S6K1* y *S6K2* que codifican para proteínas con una identidad del 87%. Se ha sugerido que *S6K2*, es la proteína homóloga de *S6K1* en mamíferos, debido a que ambas fosforilan a la proteína ribosomal S6, permitiendo con ello un aumento del reclutamiento selectivo de transcritos para proteínas ribosomales a polisomas y con ello la regulación traduccional (Mahfouz *et al.*, 2006). Además, se ha mostrado que la actividad de *S6K2* en plantas aumenta en respuesta a las auxinas y CK (Turck *et al.*, 2004). Recientemente, se describió que *S6K* fosforila a la proteína RetinoBlastoma-Related 1 (RBR1, por sus siglas en inglés), lo que estimula su localización nuclear e inhibe la actividad del factor transcripcional E2F, y así reprime la transcripción de genes que promueven el ciclo celular. Interesantemente, Xiong *et al.*, 2013 reportaron que la cinasa *AtTOR* fosforila directamente al factor E2Fa, activando la transcripción de los genes de la fase S del ciclo celular y la reactivación del meristemo de la raíz.

Otro blanco de TOR es, Type 2A Phosphatase Associated Protein of 46 kDa (TAP46, por sus siglas de inglés), una subunidad reguladora de la proteína fosfatasa 2A que estimula la fosforilación de *S6K1*. Las plantas que sobre-expresan *tap46*, presentan un incremento en la longitud del hipocotilo, hojas alargadas y un aumento en el tamaño de las semillas, así como una alta expresión de genes asociados con la biogénesis del ribosoma, la biosíntesis de lignina y la asimilación del N. En contraste, en las líneas de RNAi *tap46* se reduce la traducción y la expresión de los genes implicados en la asimilación de N y se induce la autofagia (Fig. 18) (Anh *et al.*, 2011).

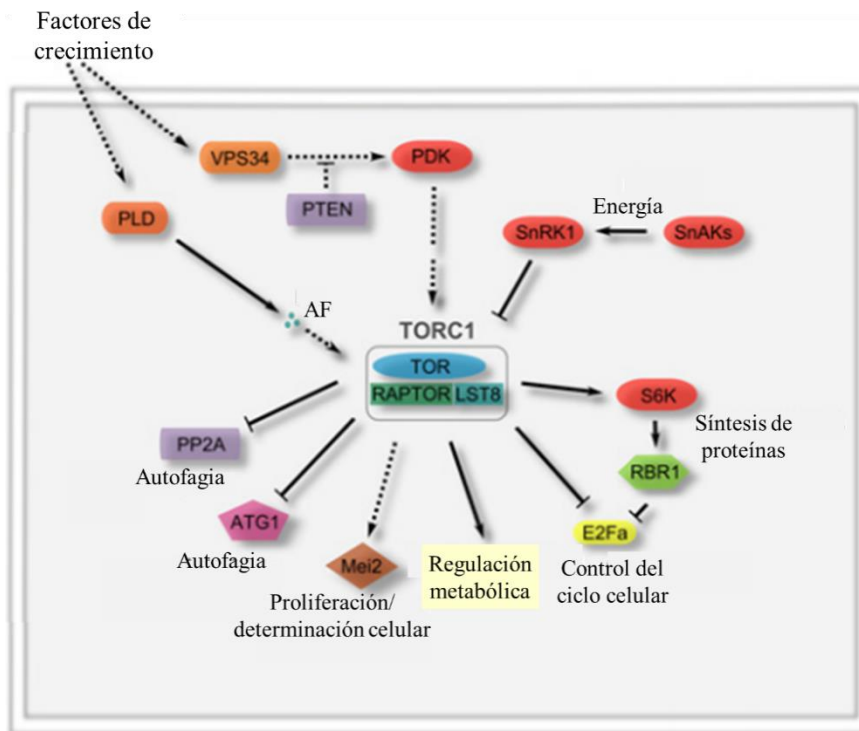


Figura 18. Componentes de la vía TOR en plantas. Elementos de la vía de señalización de TOR que se encuentran conservados en plantas y operan una red de transducción de señales que regula los procesos anabólicos y catabólicos según las condiciones de manera similar a los mamíferos (Rexin *et al.*, 2015).

En *A. thaliana*, los principales efectores de TOR son la sacarosa y la glucosa que mediante un mecanismo desconocido regulan su actividad. Básicamente, estos azúcares regulan la

actividad de TOR, que a su vez activa a los factores de transcripción E2F y WUS en el RAM y SAM, respectivamente.

Por otro lado, la inanición o defectos en la asimilación de nutrientes también afectan la actividad de TOR. Por ejemplo, una disminución en la asimilación de azufre debido a la mutación del gen sulfito reductasa reduce la actividad de TOR y el crecimiento a través de una reducción en la acumulación de azúcar (Dong *et al.*, 2017).

TOR también influye en la estructura de la pared celular, por ejemplo un nuevo supresor de *leucine-rich repeat extensin 1* (*lrx1*, por sus siglas en inglés), cuya mutación afecta la arquitectura de la pared celular, fenómeno que es compensado por una inhibición de TOR. LXR1 codifica para la isopropilmalato sintetasa 1, proteína involucrada en la biosíntesis de leucina (Schaukelberger *et al.*, 2019).

Por otro lado, se ha sugerido que la actividad de los nutrientes y energía que inducen la actividad de TOR se equilibra de forma antagónica y probablemente recíproca, a través de la SnRK1. Se ha mostrado que dicha proteína fosforila a RAPTOR, un componente del complejo TORC1 e inactiva a TOR. Recientemente se ha mostrado que SnRK2 fosforila a RAPTOR e inactiva a TOR en respuesta al ABA. TOR puede reprimir la señalización del ABA en condiciones normales sin estrés, al fosforilar e inactivar al receptor del ABA, PYL lo que sugiere que existe una relación estrecha y antagónica entre TOR y la señalización del ABA (Wang *et al.*, 2018).

TOR, es un módulo regulador central que tiene conexiones con muchas hormonas vegetales aparte del ABA. Por ejemplo, los brasinoesteroides suprimen parcialmente los defectos en la elongación del hipocotilo observados en las líneas deficientes en TOR y ROP2, esta última es una pequeña proteína Rho que participa en la estimulación de la actividad de TOR inducida por las auxinas.

La luz también es un inductor eficiente de TOR y recientemente se ha demostrado que la estimulación de la señalización de auxinas-ROP2-TOR y la traducción de transcritos observada en la luz están conectadas con la proteína Constitutive morphogenesis 1 (COP1, por sus siglas en inglés) (Fig. 19).

El genoma de *Arabidopsis* presenta un solo gen para TOR y LST8 y dos para RAPTOR, estos dos últimos son componentes del complejo TORC1. El estudio de la función de TOR sobre el desarrollo de plantas se retrasó respecto al de otros organismos, porque la mutación de este gen fue letal en etapas tempranas de la embriogénesis de *A. thaliana*. Deprost *et al.* (2007), observaron que el crecimiento, rendimiento de semillas, resistencia al estrés osmótico, al ácido abscísico y la sensibilidad a azúcares correlacionaba con los niveles del transcrito de *AtTOR* (Fig. 20a).

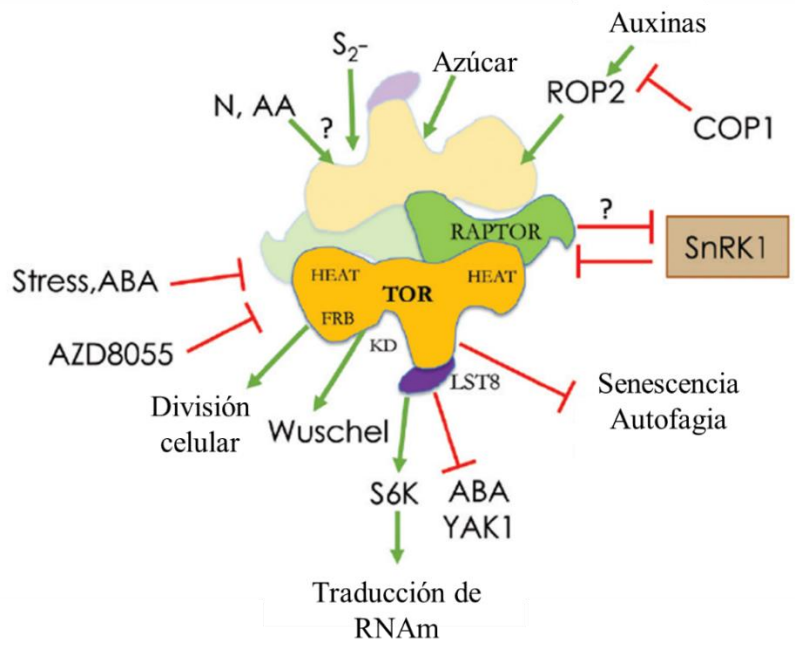


Figura 19. Efectores y blancos del complejo TORC1 en plantas. TOR forma parte del complejo TORC1 junto a las proteínas LST8 y RAPTOR. Este complejo se encuentra en todos los eucariotes y es un elemento molecular importante que conecta las señales de nutrientes, hormonas y de estrés con el metabolismo, el crecimiento y las respuestas hormonales. Además, TORC1 puede verse como un interruptor que activa los procesos anabólicos e inhibe el catabolismo y el reciclaje de nutrientes por autofagia cuando las condiciones de crecimiento son favorables. TORC1 controla la traducción de transcritos a nivel global y también de transcritos específicos como los que codifican para las proteínas necesarias para enfrentar el estrés o las respuestas hormonales. Evidencias sugieren que TOR y SnRK1/2 actúan de manera opuesta y se ha demostrado que SnRK inhibe la actividad TOR al fosforilar a RAPTOR. Recientemente, se han identificado una gran cantidad de blancos de TOR en plantas y algas, incluida la cinasa S6, la fosfatasa PP2Acompañera de TAP46, varios componentes de la maquinaria de traducción y de la división celular, y también los receptores PYL del ABA (Ryobova *et al.*, 2019).

Liu y Bassham (2010) observaron en plantas transgénicas de RNAi *AtTOR* una autofagia constitutiva, así como una disminución en la síntesis de proteínas. Mientras que la sobreexpresión de TOR causó una senescencia acelerada (González y Hanson, 2017).

Menand *et al.* (2002), utilizando la línea reportera *TOR:GUS* de *Arabidopsis*, mostraron que TOR se expresa altamente en tejidos de rápido crecimiento como el meristemo apical, el embrión y endospermo, pero no en células diferenciadas.

Desde hacía varias décadas, se había reportado que las plantas eran insensibles a la rapamicina, lo que se atribuía a una variación en la secuencia de aminoácidos de la proteína FKBP12, a la cual se une la rapamicina y posteriormente el dímero se une al dominio FRB de TOR, inhibiendo de esta manera su actividad. No obstante, Xiong y Sheen en 2012, reportaron por primera vez, que plántulas de *A. thaliana* germinadas y crecidas en medio de cultivo líquido sí presentaban sensibilidad a la rapamicina.

Actualmente, en mamíferos se utilizan inhibidores competitivos del sitio de unión al ATP de la cinasa TOR, denominados inhibidores de segunda generación como: TORIN1, TORIN2, PP242, AZD8055, KU-63794, WYE-132, WYE-354, QL-IX-55 e INK-128. A la fecha, se han probado en plantas los inhibidores: AZD8055, TORIN1, TORIN2, WYE-

132, WYE-354 y KU-63794 con una alta efectividad para inhibir a TOR, con la consiguiente alteración en el crecimiento (Xiong *et al.*, 2013; Deng *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016; Montané y Menand, 2013; Montané y Menand, 2019) (Fig. 20b).

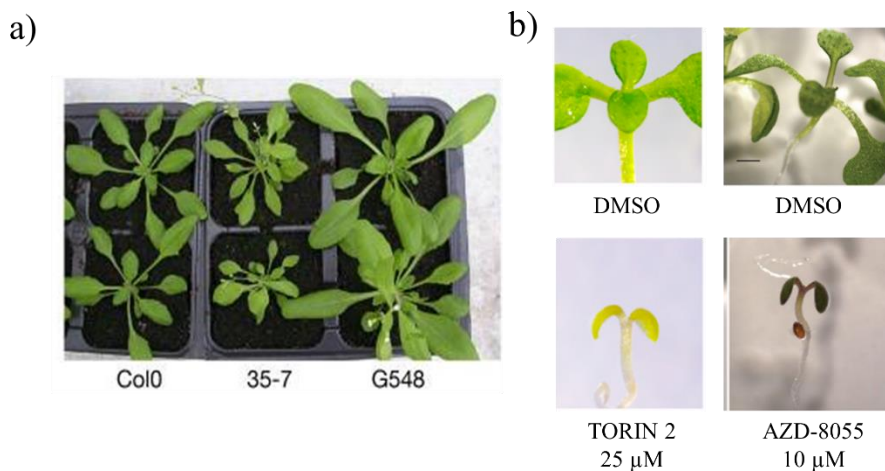


Figura 20. Efecto de la alteración de los niveles de TOR y de su actividad sobre el desarrollo de *Arabidopsis*. a) Crecimiento de *A. thaliana* silvestre (Wt) de 36 días de edad, de la línea silenciada con RNA de interferencia de TOR (35-7) y la de sobreexpresión (G548) (Deprost *et al.*, 2007). b) Inhibición del crecimiento de las plántulas de *Arabidopsis* en presencia de los inhibidores de TOR de segunda generación (Montané y Menand, 2013; Li *et al.*, 2016).

Leiber *et al.* (2010), mostraron que el crecimiento vegetal y la actividad de TOR están estrechamente vinculados a la expansión de la pared celular. El desarrollo de los pelos radiculares está mediado por la expresión de *LRR-EXTENSINI* (*LRX1*) y del *REPRESSOR OF LRX1* (*ROL5*, por sus siglas en inglés). Las mutaciones en *Arabidopsis* que interrumpen a *ROL5* (codifica una pequeña proteína G que pertenece a la superfamilia de las Ras,) mostraron que el crecimiento de los pelos radiculares fue hipersensible a la rapamicina y también presentaron defectos en la pared celular, lo que sugiere que TOR participa en la integridad de la pared celular.

Deng *et al.* (2016), observaron en las plantas de *Arabidopsis* tratadas con rapamicina y KU-63794 una disminución del marcador de auxinas en la zona meristemática de la raíz primaria, además de una inhibición significativa en la expresión de los genes *ATT1*, *TAR2*, *YUCCA1* y *YUCCA2* involucrados en la biosíntesis de auxinas, lo que sugiere que TOR afecta la síntesis de este fitoregulador.

Pfeiffer *et al.* (2016), observaron que en el SAM, la sacarosa y la luz roja promueven la expresión de *WUS*, que codifica para un factor de transcripción que se expresa en el QC. Además, análisis genéticos revelaron que la participación de los fitocromos B (phyB) y los criptocromos 1 y 2 (*CRY1/2*) en la activación de *WUS* por glucosa o sacarosa mediante la señalización de energía, es reprimida por AZD-805, lo que sugiere que TOR podría estar involucrada en la integración de la señalización de energía y luz para promover la activación de células iniciales del SAM.

Por otro lado, Li *et al.* (2016), reportaron que la reactivación de la proliferación celular del SAM depende de la glucosa y la luz, mientras que la del RAM solo de la glucosa, además que en la reactivación de ambos meristemas está involucrado TOR (Fig. 21a). Chen *et al.* (2018), evaluaron si la fosforilación de la proteína ribosomal de la subunidad

pequeña S6 (PRS6) activada por luz estimula la síntesis de proteínas y la apertura de los cotiledones y si esto depende de TOR (Fig. 21c).

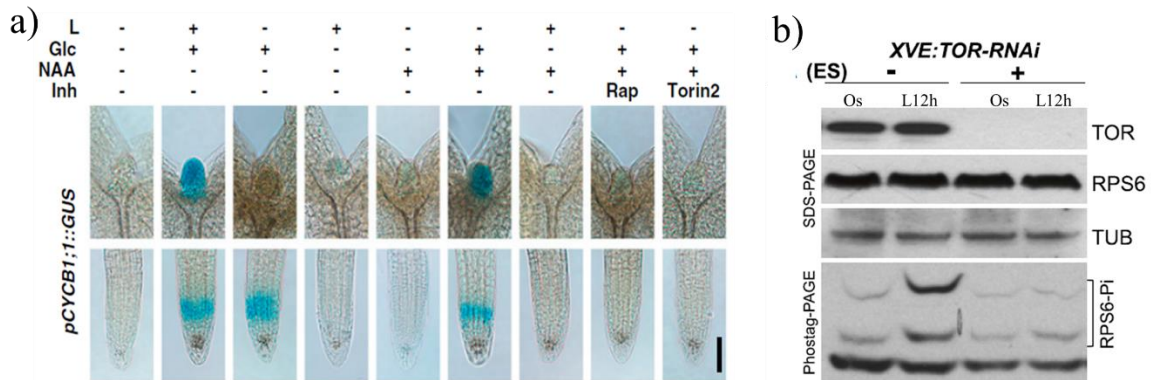


Figura 21. La reactivación de la división celular del meristemo apical y radicular y la fosforilación de RPS6 estimulada por la luz dependen de TOR. a) La glucosa y la luz reactivan la proliferación celular de ambos meristemas, además las auxinas sustituyen a la luz, reactivando junto con la glucosa la división celular (Li *et al.*, 2016). **b)** Plántulas etioladas de la línea condicional a estradiol XVE:TOR-RNAi (Os) de cuatro días de edad, fueron crecidas con (+) y sin (-) 20 μ M de estradiol durante 12h en luz. Sin la inducción de TOR, la luz no puede inducir la fosforilación de la PRS6 (Chen *et al.*, 2018).

Shi *et al.* (2018), reportaron que cada vez se descubren más factores específicos de plantas que inducen la activación de TOR, así como más blancos de esta cinasa, algunos exclusivos de plantas como la fosforilación de E2Fa que promueve la división celular y de PYL involucrado en la señalización del ABA (Fig. 22a).

TOR al fosforilar a sus blancos: S6K1/2, E2Fa/b y PYL regula la traducción de proteínas involucradas en eventos fisiológicos como: la apertura de los cotiledones y su enverdecimiento entre otros. S6K activa, fosforila a eIF3h y a RIPS (Re-Initiation-Supporting Protein), lo cual permite el reclutamiento de los factores de re-iniciación y la formación de polisomas para reiniciar la traducción de los mRNAs. Además, Ma3 domain-containing translation Regulatory Factor 1 (MRFI, por sus siglas en inglés), regula la traducción de transcritos en condiciones deficientes de energía.

En presencia de nutrientes, TOR fosforila a ATG13 para prevenir la formación del complejo ATG1-ATG13 que modula la autofagia (Fig. 22a) (Shi *et al.*, 2018). Mientras que E2Fa/b regula al ciclo celular, activando al meristemo, la iniciación del desarrollo de las hojas y la endoreduplicación. En tanto la señalización del ABA regula la germinación de semilla y el enverdecimiento (Fig. 22b) (Wu *et al.*, 2019).

En condiciones deficientes de S, la actividad de TOR es reprimida, lo que causa la lipidación de ATG8 y el inicio de la activación de la autofagia (Shi *et al.*, 2018).

Se ha reportado que la fotosíntesis o el suministro de glucosa exógena estimulan la señalización de la vía TOR-S6K (Xiong *et al.*, 2013). Sin embargo, aun en presencia de glucosa o sacarosa, la vía de TOR no se activa cuando falta nitrógeno o fósforo, lo que sugiere que estos elementos y/o sus derivados metabólicos son señales para la activación de TOR.

La reciente caracterización de una mutante en la ATP sintasa mitocondrial *phi1*, insensible al fosfito 1 (fósforo no metabolizable que desencadena la señalización de

fósforo), mostró defectos en el crecimiento de la raíz y un deterioro constitutivo de las mitocondrias, semejante al tratamiento con oligomicina (un inhibidor de la ATPasa mitocondrial específica). Además, parece ser que el nitrato, el amonio y los aminoácidos, también están involucrados en la activación de la vía TOR-S6K (Wu *et al.*, 2019).

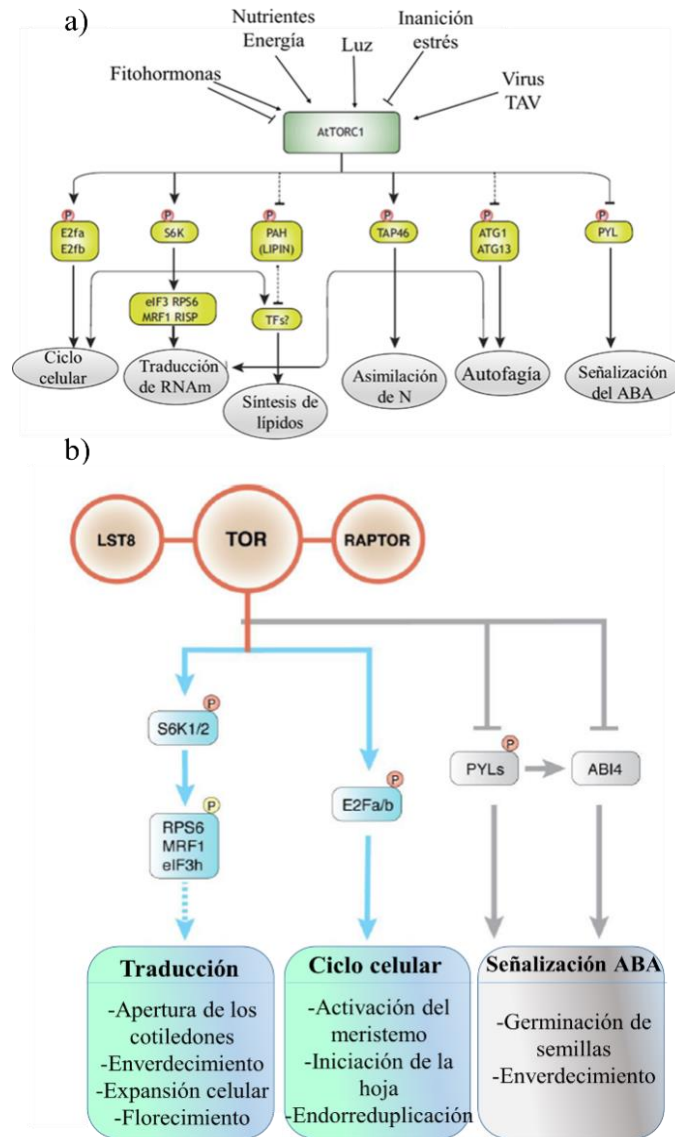


Figura 22. TOR es activada por diferentes efectores. a) TOR es activada por nutriente, energía, auxinas, luz y el virus TAV e inactivada por fitohormonas y estrés por inanición. b) El complejo TORC1 activo fosforila a sus blancos: S6K1, E2Fa/b y a PYLs que regulan diversos eventos fisiológicos (Wu *et al.*, 2019).

2.5 La rizósfera: Un microambiente complejo y dinámico

El término rizósfera utilizado por primera vez a finales del siglo XIX por Hiltner, agrónomo alemán, define una capa de suelo alrededor de la raíz de aproximadamente un mm de ancho y sin borde definido. La rizosfera se considera uno de los hábitats microbianos más diversos con respecto a la riqueza de especies y el tamaño de la comunidad. Dicha comunidad puede afectar la salud de las plantas al desempeñar funciones importantes en la adquisición de nutrientes, la protección contra las condiciones

ambientales adversas y los patógenos de las plantas, y en la promoción del crecimiento de las plantas, mediada por la producción de hormonas vegetales (Hartmann *et al.*, 2015).

Una gran variedad de bacterias se asocian e interactúan con la raíz y estimulan el crecimiento vegetal mediante diversos mecanismos directos e indirectos. Los primeros incluyen la fijación del nitrógeno atmosférico por bacterias de vida libre (Bashan y de-Bashan, 2010), la formación de nódulos, la producción de reguladores del crecimiento vegetal como las auxinas, CK y GA (Gutiérrez-Mañero *et al.*, 2001).

Los mecanismos indirectos involucran la competencia con otros microorganismos fitopatógenos mediante la producción de antibióticos que inhiben su crecimiento (Whipps, 2001; Schwartz *et al.*, 2015; Hamed y Mohammadipanah, 2015; Chowdhury *et al.*, 2015) y la producción de sideróforos (compuestos quelantes del hierro secretado por las bacterias) (Wang *et al.*, 2014) o la inducción de la resistencia sistémica en las plantas (resistencia conferida en respuesta al ataque del patógeno) (Annapurna *et al.*, 2012; Rangel de Souza *et al.*, 2015).

2.6 Interacción planta-bacteria

La asociación planta-bacteria ha sido estudiada durante varias décadas y se ha observado que la concentración de bacterias alrededor de las raíces es generalmente más alta que la encontrada en el resto del suelo. Esto se ha atribuido a que los exudados (que representan del 5 al 30% del carbono fijado de forma fotosintética) secretados por las raíces, se utilizan como fuente de carbono por las bacterias.

Los mecanismos empleados por las bacterias del suelo para facilitar el crecimiento son bien conocidos en las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) (Santoyo *et al.*, 2016). Debido a su capacidad para colonizar las superficies radiculares, rizosfera y filosfera y tejidos internos de la planta, las PGPR pueden estimular el crecimiento de las plantas directamente o indirectamente; en el primer mecanismo, facilitando la adquisición de hierro, nitrógeno y fósforo del ambiente o sintetizan auxinas, citocininas y etileno (Fig. 23). Mientras que, en el indirecto, 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).

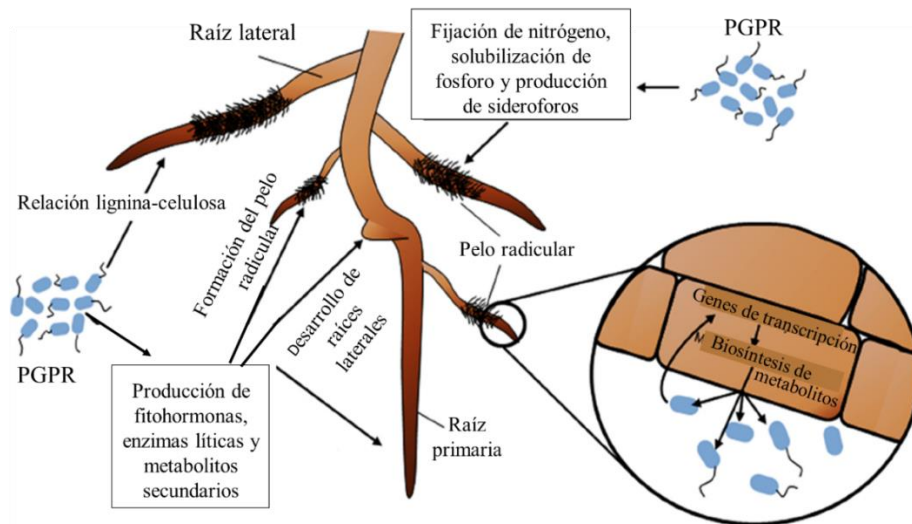


Figura 23. Las PGPR modulan el desarrollo de la raíz a través de la producción de fitohormonas, metabolitos secundarios y enzimas. Las PGPR influyen en la nutrición de las plantas a través de la fijación de nitrógeno, la solubilización del fósforo o la producción de sideróforos. Todos estos factores modifican la fisiología de la raíz mediante el cambio de la transcripción de genes y la biosíntesis de metabolitos de las células vegetales (Vacheron *et al.*, 2013).

Las raíces excretan exudados a la rizosfera entre los que se encuentran: i) ácidos orgánicos que al disminuir el pH, facilitan la solubilización del fosfato del suelo y lo hacen más disponible a las plantas, ii) sacarosa que sirve como fuente de carbono para la bacteria y iii) fitohormonas como el AIA, CK, ABA, el GA y el etileno (Et).

El AIA secretado por las plantas también funciona como molécula señal para que *Azospirillum* a su vez lo sintetice, libere y la planta lo absorba, lo que resulta en un incremento del número de raíces laterales que facilita la adquisición de agua y nutrientes y permite un aumento del crecimiento del follaje y rendimiento de semillas (Fig. 24) (Lambrecht *et al.*, 2000).

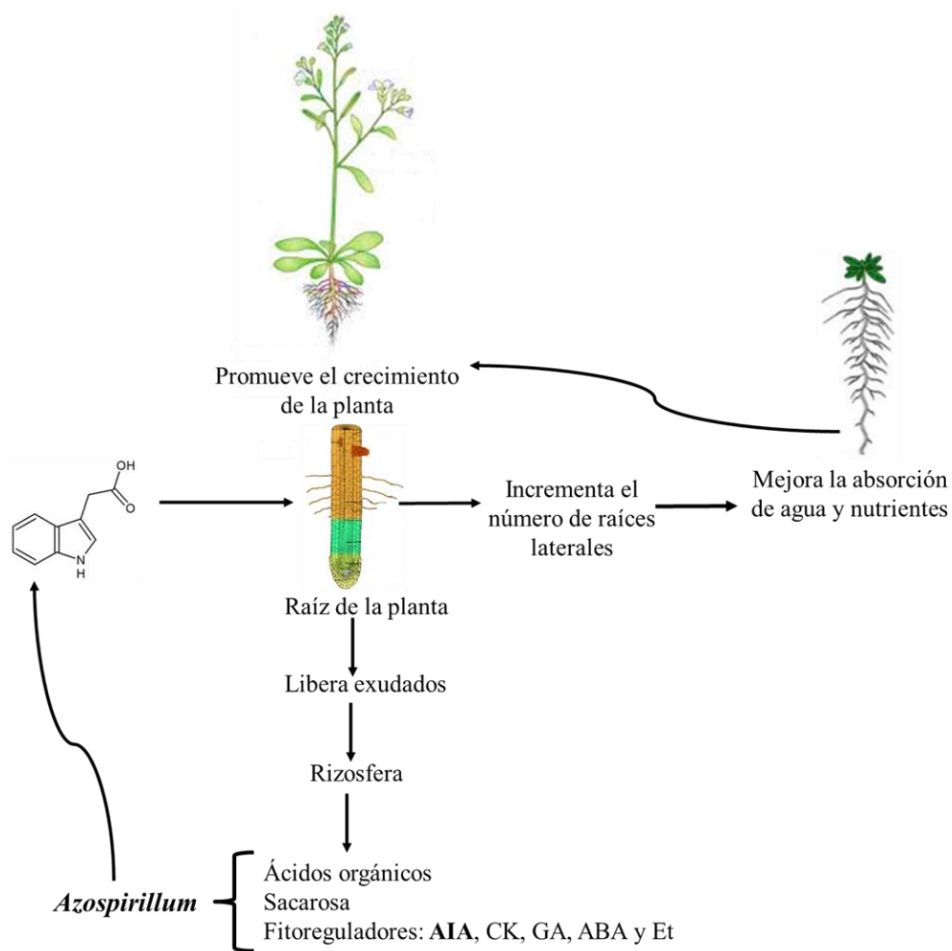


Figura 24. Efecto de la interacción planta-PGPR. Las plantas producen exudados radiculares que aportan nutrientes a la bacteria. Algunas PGPR estimulan el crecimiento vegetal por un mecanismo directo mediante la producción de fitohormonas como el AIA (Lambrecht *et al.*, 2000).

El efecto general de las PGPR sobre el sistema radicular de las plantas, consiste en una disminución de la longitud de la raíz primaria, un aumento del número de raíces laterales y un mayor crecimiento del follaje (Fig. 25) (Verbon y Liberman, 2016).

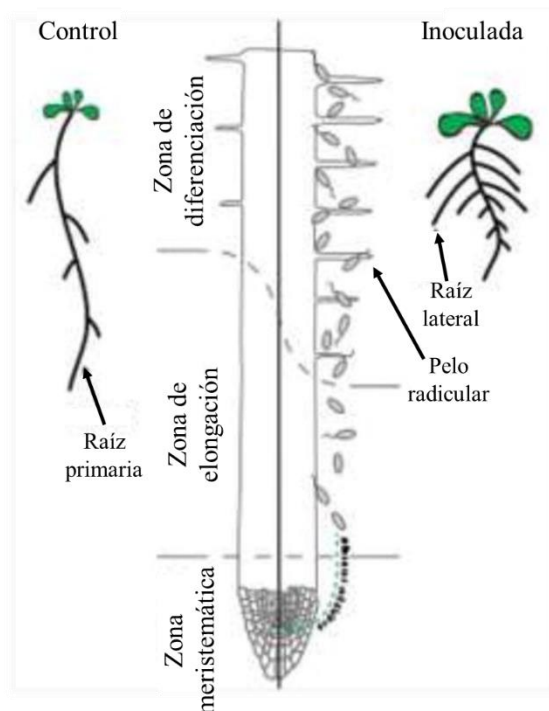


Figura 25. Las bacterias influyen sobre la fisiología vegetal y el desarrollo de la arquitectura radicular de la planta. Las PGPR cuando se aplican a las raíces de la plantas, aumentan el crecimiento de la parte aérea, disminuyen la longitud de la raíz primaria e incrementan el número de raíces laterales (Verbon y Liberman, 2016).

2.7 Características de *Azospirillum brasilense*

El nombre *Azospirillum* proviene del francés *Azote*, que significa nitrógeno y del grupo *Spirillum*, pequeño espiral. *Azospirillum* es una PGPR que pertenece a la subclase α -proteobacteria. *Azospirillum* presenta una forma pleomórfica con un diámetro de 0.8-1 μm de ancho y 2-5 μm de largo (Fig. 26). La bacteria ha sido aislada de la rizosfera de gramíneas, particularmente de cultivos de importancia económica tales como el maíz, el trigo y el arroz, desde climas tropicales hasta templados (Patriquin *et al.*, 1983).

La bacteria puede formar quistes y presenta flagelos polares que le permiten moverse hacia la raíz de la planta para utilizar sus exudados como fuente de carbono y a su vez promover el crecimiento vegetal a través de diferentes mecanismos que incluyen la secreción de fitohormonas, la solubilización de macro y micro nutrientes como el fósforo, fierro y la fijación del nitrógeno entre otros factores (Spaepen *et al.*, 2009).

Azospirillum es capaz de mejorar significativamente el crecimiento, desarrollo y productividad de más de un ciento de especies vegetales a través de la colonización de la parte interna o externa de la raíz. En esta última, la bacteria puede formar pequeños agregados o células aisladas distribuidas a lo largo de la superficie radicular de la planta (Patriquin *et al.*, 1983). *Azospirillum* tiende a colonizar preferencialmente la zona de elongación de la raíz y de los pelos radiculares.

Debido a que *Azospirillum* aumenta la producción de semillas, ha sido una de las PGPR más estudiadas en cultivos de interés agrícola por la importancia económica de estas plantas a nivel mundial (Hungria *et al.*, 2010). Se ha reportado que los biofertilizantes que contienen esta rizobacteria incrementan un 9% la producción de semillas y un 18% el peso seco de las plantas de trigo (Veresoglou y Menexes, 2010). Además, aumenta el rendimiento entre un 5% y 30% en maíz, trigo, sorgo, arroz y leguminosas (Dobbelaere *et al.*, 2003; Díaz-Zorita y Fernandez-Canigia, 2009; Hungria *et al.*, 2010).

El efecto de *Azospirillum* sobre el desarrollo vegetal se ha atribuido a la gran cantidad de fitohormonas que produce, principalmente las auxinas; fitohormona involucrada en todos los procesos de desarrollo vegetal (Lugtenberg y Kamilova, 2009; Spaepen *et al.*, 2009; Spaepen *et al.*, 2014).

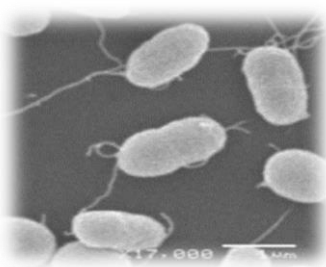


Figura 26. *Azospirillum brasilense*. Esta bacteria que pertenece al grupo de las PGPR, presenta un flagelo polar que le permite moverse hacia las raíces de la planta. Entre los fitoreguladores que sintetiza este microorganismo se encuentran el AIA, CK, ABA, GA y el etileno (Burdman *et al.*, 1997).

2.7.1 Interacción *Arabidopsis*-*Azospirillum*

La interacción *Azospirillum*-*Arabidopsis* fue reportada por Spaepen *et al.* (2014), donde evaluaron el efecto de las auxinas producidas por la bacteria, al inocular a *A. thaliana* con dos cepas de *A. brasilense* Sp245: una silvestre y otra mutante en la biosíntesis de auxinas (FAJ009). La inoculación con la cepa silvestre provocó una disminución en la longitud de la raíz primaria y un aumento en el número de raíces laterales y la formación de pelos radiculares, mientras que la inoculación con la mutante no alteró la arquitectura radicular de las plantas. Estos resultados les permitieron sugerir a los autores que las auxinas producidas por la bacteria podrían estar involucradas en los cambios morfológicos de la arquitectura radicular de *Arabidopsis*.

Mientras que Arreola-Rivera 2018, evaluó el efecto de *A. brasilense* sobre los parámetros de la arquitectura radicular de *Arabidopsis*, encontrando que la bacteria induce un gran incremento del número de raíces laterales (NRL). Además determinó que elementos de la red de respuesta a las auxinas podrían estar involucrados en tal efecto, sus resultados mostraron que para que *Azospirillum* estimule el NRL se requiere activo el PAT de la planta (Fig. 27c). También observó que otros elementos que participan en la regulación del PAT, como el transportador de eflujo PGP1 y la Protein Auxin Response4 (AXR4) y BEN2 que ayudan al posicionamiento de los transportadores AUX/LAX y PIN respectivamente están involucrados (Fig. 27a-b).

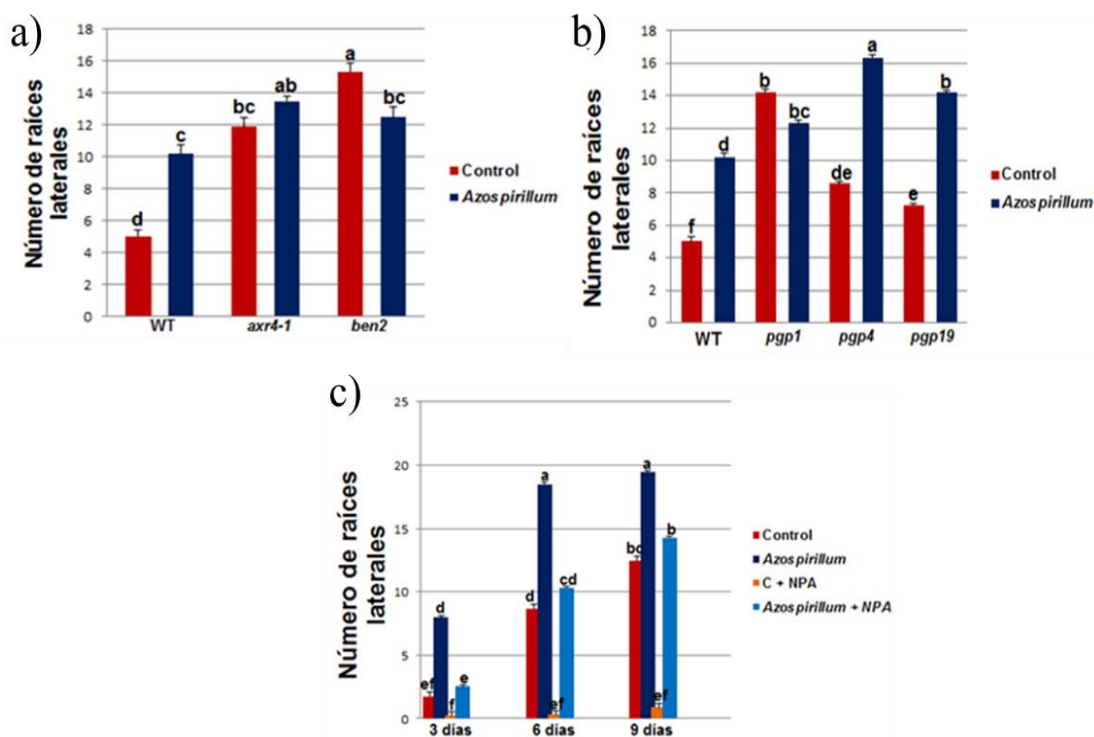


Figura 27. Efecto de *Azospirillum* sobre el número de raíces laterales en plántulas de *Arabidopsis*. a) Plántulas Wt, *axr4-1* y *ben2* de *Arabidopsis* de 5 dde fueron transferidas a medios control y suplementados con 2.5×10^5 UFC/mL de *Azospirillum* e incubadas 9 días. b) Plantulas Wt, *pgp1*, *pgp4* y *pgp19* de *Arabidopsis* de 5 dde fueron transferidas a medios control y suplementados con 2.5×10^5 UFC/mL de *Azospirillum* e incubadas 9 días. c) Plantulas Wt de *A. thaliana* de 5 dde fueron transferidas a medios control y suplementados con 2.5×10^5 UFC/mL de *Azospirillum*, y estos mismos medios suplementados con NPA (1 μ M) e incubadas 9 días (Arreola-Rivera, 2018).

2.7.2 Efecto de TOR en la interacción planta-microorganismo

Debido a la función central de la vía TOR en la regulación de la expresión génica, la síntesis de proteínas y los ajustes metabólicos se cree que es probable que también participe en las respuestas de defensa durante la infección de la planta por patógenos o en las interacciones benéficas planta-microorganismos (Rybova *et al.*, 2019).

Se ha observado que la inhibición de TOR con AZD-8055 bloquea el crecimiento de *Xanthomonas citri* en *Citrus* spp, debido a que el efector PthA4 de *X. citri* interactúa con Maf1, un blanco de TOR conservado y represor de la Pol III y del crecimiento (Anh *et al.*, 2019).

Las leguminosas establecen interacciones simbióticas con las bacterias del suelo que fijan el nitrógeno, por medio de estructuras especializadas de las raíces conocidas como nódulos. El programa simbiótico se inicia con un diálogo químico entre los rizobios y las plantas que conduce a la producción rizobial de lipocitoligosacáridos (factor nod), que inducen una serie de respuestas fisiológicas en los pelos radiculares, que incluyen oscilaciones en la concentración de calcio, inducción de los genes simbióticos y rizado

del pelo radicular para atrapar a las bacterias (Ehrhardt *et al.*, 1996; Oldroyd y Downie, 2008).

Posteriormente, la hidrólisis de la pared celular y la invaginación de la membrana plasmática permite la formación de hilos de infección (IT), que atraviesan la base de la célula ciliada de la raíz (Nanjareddy *et al.*, 2016). Los IT se extienden desde el sitio de infección hacia las células corticales en división donde se ramifican (Fig. 28).

Recientemente, se reportó que *TOR* se expresa en diferentes tejidos de frijol, siendo el meristemo de la raíz donde se observó una expresión más fuerte y se detectaron niveles más altos del transcrito de *TOR* en las hojas e hipocotilo que en la flor y la vaina (Nanjareddy *et al.*, 2016). Cuando las plantas de frijol fueron inoculadas con *Rhizobium tropici*, la abundancia del transcrito de *TOR* fue más alta en las raíces desprendidas de nódulos (nodule-detached roots). A partir de la etapa temprana de la infección (24 h después de la inoculación ddi), en las raíces inoculadas con *Rhizobium* la transcripción de *TOR* aumentó de manera constante hasta las 48 ddi y luego disminuyó a las 96 ddi.

En contraste, la inducción de la transcripción fue significativamente más fuerte en los nódulos de 5 a 14 ddi y luego disminuyó a medida que los nódulos maduraban hasta los 21 hdi. Interesantemente, los niveles de la expresión de *TOR* aumentaron drásticamente con el inicio de la senescencia de los nódulos. Estos resultados muestran que la inducción de la expresión de *TOR* se asocia con tres etapas importantes de la simbiosis: infección temprana, desarrollo de nódulos y senescencia (Fig. 28).

Por otra parte, las plantas para sobrevivir al ataque de patógenos microbiales e insectos herbívoros han desarrollado un sistema inmune compuesto por dos ramas interconectadas: 1) inmunidad inducida (PTI) por Pathogen-Associated Molecular Pattern (PAMP) y 2) Efector-Triggered Immunity (ETI), siendo esta última suficiente para impedir la colonización del patógeno y reprimir el desarrollo de la enfermedad.

El éxito de la colonización del patógeno se debe a que interrumpe la ETI al inyectar pequeñas proteínas efectoras dentro del apoplasto o del citosol del huésped. Las plantas a su vez, se han adaptado para reconocer a los efectores específicos del atacante por medio de proteínas de resistencia intracelular o transmembranales, lo que desencadena la ETI. Como la PTI y la ETI están asociadas al consumo de energía, la activación inmune de la planta necesita ser estrechamente regulada (Herms y Mattson, 1994; Huot *et al.*, 2014).

La llamada compensación entre el crecimiento y la defensa, se debe a que las plantas poseen recursos limitados que exigen la priorización del crecimiento o la inmunidad, dependiendo de las condiciones prevalentes.

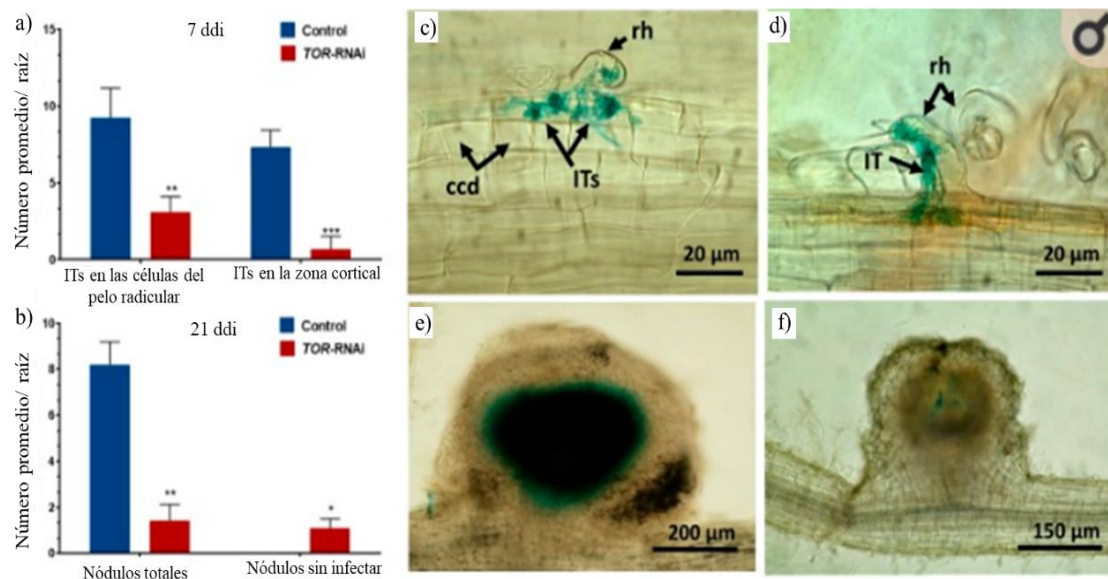


Figura 28. Fenotipo de los ITy de los nódulos en la raíz de frijol inoculada con *R. tropici*. a) Número promedio de IT que se encuentran en las células ciliadas de la raíz y en las corticales en división de las raíces control y de la línea transgénica *TOR-RNAi*. b) Imagen representativa que muestra la progresión normal del IT, con divisiones de células ramificadas y corticales, en raíces control. c) En contraste, en las raíces *TOR-RNAi*, el IT es más amplio y fue detenido dentro de la célula pilosa de la raíz. d) Número de nódulos en las raíces de la planta control y en las *TOR-RNAi* a 21 ddi. e y f) Imágenes representativas de nódulos jóvenes que muestran tejido central completamente colonizado en las raíces de las plantas control (e) y en el tejido central no infectado en raíces *TOR-RNAi* (f) (Nanjareddy *et al.*, 2016).

Vleeschauwer *et al.* (2017), utilizaron como modelo de estudio plantas de arroz para investigar si TOR modula la interacción patógeno-arroz, para lo cual, primero analizaron el fenotipo de las plantas de sobre y baja expresión de TOR. Las primeras, presentaron brotes largos (Fig. 29 a-d), un aumento del crecimiento de las raíces y del tamaño de las células epidérmicas y mesófilas, un mejoramiento en la maduración, floración temprana y mayor rendimiento de semillas, mientras que en líneas *OsRaptor1*, se observó un crecimiento reducido en las raíces y los brotes.

Al evaluar el efecto de la rapamicina y Torin2, observaron en presencia del primero, una reducción en la elongación de la raíz de manera dosis dependiente y una pérdida parcial del gravitropismo. En tanto que Torin2 provocó una reducción en la elongación de la raíz y del brote, lo que sugiere que TOR regula el crecimiento y desarrollo del arroz. Posteriormente, al inocular plantas de arroz de las líneas *OsTOR*, *OsRaptor1 OX* y *RNAi OsRaptor1* con la bacteria patógena *Xanthomonas oryzae* pv, observaron que las plantas *OsTOR* y *OsRaptor1 OX* de 12 ddi, presentaban una susceptibilidad significativamente mayor para la bacteria hemibiotrófica Xoo, que causa la enfermedad del tizón de la hoja. Por el contrario, las plantas *RNAi OsRaptor1* exhibieron una reducción del 50% en la longitud de la lesión. Estos resultados les permitieron sugerir que TOR actúa como un regulador negativo de la resistencia a Xoo (Fig. 29 e).

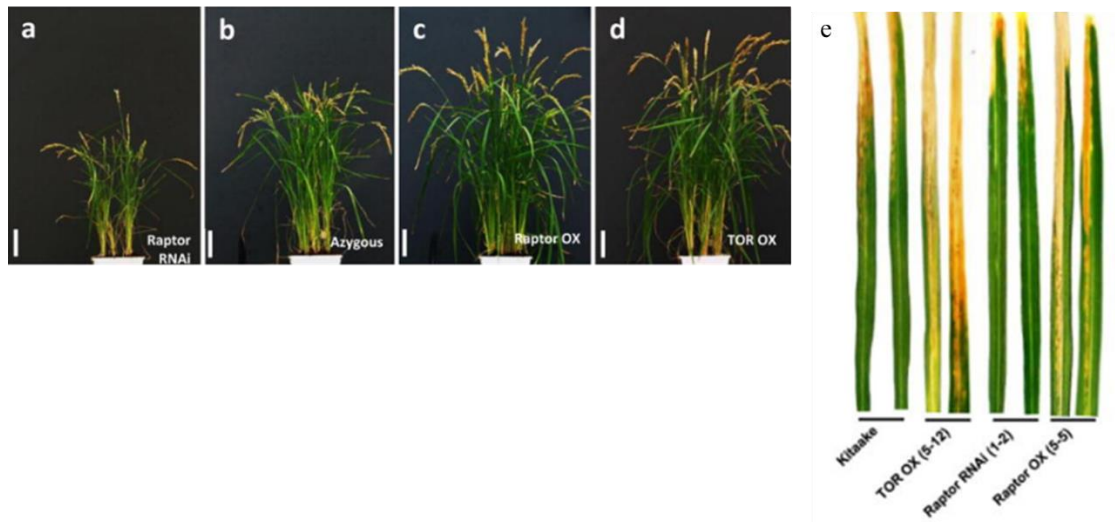


Figura 29. TOR regula el desarrollo y los mutantes de *RAPTOR* en arroz presentan resistencia a *Xanthomonas oryzae* pv. a-d) Fenotipos de líneas de arroz de sobre y baja expresión de TOR. Las fotografías fueron tomadas 12 semanas después de la germinación. e) La fotografía muestra el daño causado por la enfermedad del tizon de la hoja en plantas de arroz de 12 ddi (Vleeschauwer *et al.*, 2017).

Por otra parte, se conoce que *Fusarium* es uno de los géneros más importantes de hongos patógenos de las plantas que causan la enfermedad del tizón de la cabeza de *Fusarium* (FHB) en trigo, cebada y otros cereales, lo que ocasiona una disminución en la calidad y rendimiento del grano.

Recientemente, Aznar *et al.* (2018), evaluaron la interacción *Arabidopsis-Fusarium graminearum* en las líneas *raptor3g*, *lst8.1*, *lst8.2* y en la mutante condicionada *tor-es*. Las hojas de roseta de las plantas de las líneas antes mencionadas, fueron inoculadas con un aislado virulento de *Fusarium* lo que causó en las plantas silvestres los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, una reacción de resistencia fue observada en las líneas *raptor3g*, *lst8.1* y *lst8.2*, donde *lst8.1* mostró mayor resistencia a la infección del hongo que la Wt, pero fue más susceptible que la línea *tor-es* y *raptor3g* (Fig. 30). Los resultados antes descritos, demostraron que la baja regulación de la señalización de TOR le confiere a las plantas una resistencia/tolerancia a la infección de *Fusarium*.

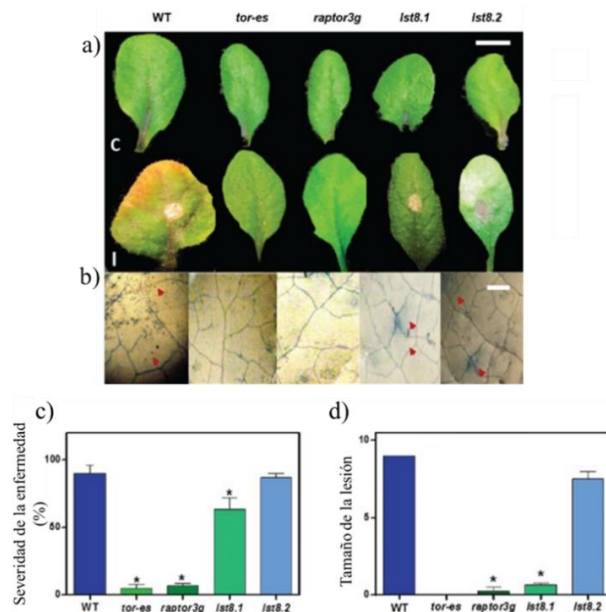


Figura 30. Las mutantes del complejo TORC1 de *Arabidopsis* presentan resistencia a la infección de *Fusarium graminearum*. a) Síntomas de la enfermedad del tizón de la cabeza de *Fusarium* en las líneas mutantes del complejo TORC1 de *Arabidopsis* a los 7 ddi con *Fusarium* respecto al control e inoculadas (I). b) Crecimiento micelial de *Fusarium* y muerte celular de las plantas. Las hojas de (a) se tiñeron con reactivo azul tripano y se visualizaron bajo estereoscopio. c) Evaluación de las resistencias a la infección por *Fusarium* en hojas de plántulas Wt y mutantes del complejo TOR de *Arabidopsis* a los 7 ddi. d) Medición del tamaño de la lesión, la expansión de las lesiones en las hojas de *Arabidopsis* fueron medidas a los 7 ddi con *Fusarium* (Aznar *et al.*, 2018).

Como se mencionó antes, TOR en plantas además de regular el metabolismo y crecimiento vegetal está relacionada con el establecimiento de la interacción planta-microorganismo de manera benéfica o patógena. Es por esta razón, que en el presente trabajo se evalúa la función de TOR sobre el PAT en plántulas de *Arabidopsis* expuestas a *Azospirillum brasilense*.

3. JUSTIFICACIÓN

Considerando que *Azospirillum brasilense* Sp245 altera la arquitectura radicular de *Arabidopsis* a través del transporte de auxinas y que TOR es activada por las auxinas, es decir, esta fitohormona parece ser el enlace en dos procesos diferentes, es importante determinar la participación de TOR sobre el desarrollo radicular durante la interacción *Arabidopsis*-*Azospirillum*.

4. HIPÓTESIS

Azospirillum brasilense Sp245 altera el desarrollo radicular de *Arabidopsis* a través del transporte de auxinas mediado por TOR

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Caracterizar la participación de TOR en el desarrollo radicular de *Arabidopsis* en respuesta a las auxinas sintetizadas por *Azospirillum*

5.1.1 Objetivos específicos

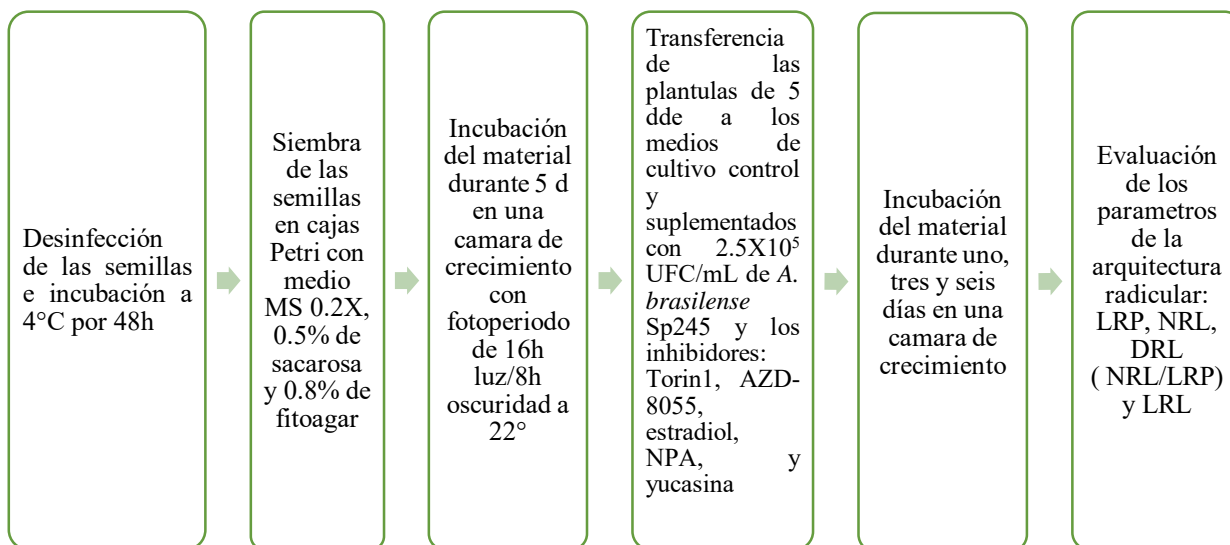
1. Demostrar la participación de TOR en la interacción *Arabidopsis-Azospirillum*
2. Analizar el efecto del AIA exógeno sobre el fenotipo inducido por *Azospirillum* en plántulas de *Arabidopsis*
3. Evaluar el efecto de *Azospirillum* sobre plántulas de *Arabidopsis* con diferentes niveles endógenos de auxinas
4. Determinar la participación de TOR sobre el transporte polar de auxinas en plántulas de *Arabidopsis* expuestas a *Azospirillum*

6. METAS

1. Determinar la participación de TOR en la interacción *Arabidopsis-Azospirillum*, con el uso de los inhibidores de TOR: AZD-8055 y Torin1 y la mutante condicionada *tor-es1 DR5:uidA*
2. Analizar el efecto de diferentes concentraciones del AIA y de *Azospirillum* sobre la Arquitectura Radicular y el nivel de auxinas en plántulas *DR5:uidA*
3. Evaluar el efecto de *Azospirillum* sobre la AR de las plántulas de las líneas *35S:YUCCA4 DR5:uidA* y *yucca6 yucca3* expuestas a yucasina
4. Determinar el efecto del NPA sobre la AR de plántulas *tor-es1 DR5:uidA* y del AZD-8055 sobre la AR de las plántulas *pgp1*, *axr4-1* y *ben2* expuestas a *Azospirillum*

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

7.1 Estrategia experimental general



8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Material vegetal

En este estudio se utilizaron semillas de las siguientes mutantes en el fondo genético Col-0: *yucca6 yucca3*, *35S:YUCCA4DR5:uidA* (donadas amablemente por Munguía-Rodríguez A.), *pgp1* (Dharmasiri *et al.*, 2005), *ben2* (Tanaka *et al.*, 2009), *axr4-1* (Hobbie y Estelle, 1995), y la mutante *tt4* en el fondo genético Ler (Burbulis *et al.*, 1996). También se ensayó la mutante condicionada a estradiol *tor-es1DR5:uidA* (semillas donadas por Dr. Sheen). Las líneas reporteras analizadas fueron *DR5:uidA* (Ulmasov *et al.*, 1997), *CyCB1::uidA* (Colón-Carmona *et al.*, 1999) y *Exp7:uidA* (Cho y Cosgrove, 2002).

8.2 Desinfección, siembra e incubación de las semillas

Las semillas de las diferentes líneas de *Arabidopsis* se desinfectaron con una solución de cloro al 5% y dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1% y se lavaron con agua tridestilada estéril. Finalmente, se incubaron en un mL de agua a 4°C por 48 h y posteriormente, fueron sembradas en cajas Petri que contenían el medio de cultivo Murashige-Skoog 0.2X MS, 0.5% de sacarosa, 0.8g/L de fitoagar y 200 µL de una solución de vitaminas. Las cajas se incubaron en posición vertical en una cámara de crecimiento con fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad a 22°C durante 5 días, para obtener las plántulas de 5 días de edad (dde).

8.3 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 la concentración 0.2X 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 fitoagar. Al medio tibio previamente esterilizado a 121°C por 20 min se añadió 200 µL/L de una solución de vitaminas (tiamina 1mg/mL, piridoxina 5 mg/mL y ácido nicotínico 5 mg/mL).

8.4 Preparación de medios de cultivo suplementados con inhibidores

Para la preparación de medios de cultivo con diferentes componentes, al medio tibio antes mencionado, se añadieron las siguientes moléculas (todas las soluciones fueron disueltas en DMSO): 100 µM de yucasina (donada amablemente por Dr. Nishimura T.) inhibidor de la síntesis endógena del AIA a partir de una solución stock de 50 nM de yucasina; 1 µM NPA (Sigma) inhibidor del PAT partiendo de un stock de 1 mM y para la inhibición de TOR se agregó 1000 nM de AZD-8055 (LC Laboratories) y 500 nM de Torin1 (LC Laboratories), de los stocks de 1 y 0.5 mM, respectivamente. En los experimentos con la línea mutante condicionada a estradiol *tor-es1DR5:uidA* de *Arabidopsis* se agregó al medio 10 µM de estradiol (Sigma) a partir de un stock de 5 mM.

8.5 Preparación del medio de cultivo para el mantenimiento de *Azospirillum* Sp245

La bacteria se mantuvo en medio de cultivo LB-tetraciclina (peptona 10g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L, MgSO₄ 0.186 g/L, CaCl₂ 0.2775 g/L, agar 1 g/L y tetraciclina 10 µg/mL) a 4°C. El cultivo de bacteria fue resembrado cada 10 días en cajas Petri con medio LB-tetraciclina, el cual se incubó toda la noche a 37° C. Cuando la bacteria se utilizó para adicionarla al medio MS, se resembró e incubó 16 h a 37°C, posteriormente de esta caja se tomó una azada de la bacteria y se resuspendió en un mL de agua destilada estéril, se midió la absorbancia de la solución a 600 nm y a partir de la relación 0.9 Abs equivalente a 1X10⁸ UFC/mL se determinó la concentración de la solución stock. Después, se calculó el volumen requerido de esta última solución para obtener la concentración de 2.5X10⁵ UFC de *Azospirillum* por mL de medio, el cual se agregó al igual que la solución de vitaminas, al medio 0.2X MS, 0.5% de sacarosa, 0.8% de fitoagar previamente esterilizado y tibio.

8.6 Transferencia de las plántulas a medios de cultivo suplementados con *Azospirillum brasilense* Sp245 y con los diferentes inhibidores

Las plántulas de 5 dde se transfirieron a las cajas Petri que contenían el medio 0.2X de MS sin la bacteria (control) y suplementado con 2.5X10⁵ UFC/mL de *A. brasilense* con los diferentes tratamientos. Las cajas sembradas se incubaron durante 1, 3 y 6 días en la cámara de crecimiento en las condiciones antes mencionadas.

8.7 Actividad histoquímica *uidA*

Las plántulas de las líneas reporteras *tor-es1DR5:uidA*, *CyB1:uidA* y *Exp7:uidA* de *Arabidopsis* de 5 días de edad (dde) fueron expuestas a la bacteria por 1, 3 y 6 días. Al finalizar estos tiempos de exposición, las plántulas se colocaron en cajas para microtítulo donde se incubaron con una disolución de X-Gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucoronido) al 0.1% en un amortiguador de fosfatos (NaH₂PO₄ y Na₂HPO₄ 0.1M pH 7) con K₄Fe(CN)₆ y K₃Fe(CN)₆ 2 mM a 37°C por 4 h (Jefferson *et al.*, 1987). Al final del tiempo de incubación, las plántulas se incubaron en una disolución ácida (HCl 0.24N, metanol al 20%) durante 80 min a 60°C. Posteriormente, se incubaron en una disolución básica (NaOH al 7%, EtOH al 60%) por 40 min a temperatura ambiente. Al finalizar el tiempo se decantó la solución y se añadieron disoluciones con diferentes concentraciones de etanol (40, 20 y 10%), donde se incubó el material por 15 min en cada una de las disoluciones a temperatura ambiente (Malamy y Benfey, 1997). Finalmente se agregó glicerol al 50% y se incubaron una noche, las plántulas se montaron en portaobjetos, se observaron al microscopio con el objetivo de 5 y 10X y se tomaron las fotografías de la raíz primaria y de las raíces laterales.

8.8 Evaluación de los parámetros de la arquitectura radicular de las plántulas

Evaluación de los parámetros de la arquitectura radicular. Las observaciones del sistema radicular de las plántulas de *A. thaliana* se hicieron con un estereomicroscopio (Iroscope ES-24). Las raíces laterales que emergieron de la raíz principal se observaron con el

objetivo 4X y se contó el número total de raíces en cada una de las plántulas (NRL). La longitud de la raíz primaria (LRP) se midió con una regla. La densidad de raíces laterales (DRL) se calculó dividiendo el número de raíces laterales entre la longitud de la raíz primaria.

8.9 Evaluación del crecimiento de las RL

El crecimiento de las raíces laterales se determinó mediante fotografías de las plántulas con un acercamiento de la ZD de la RP, para después medir la longitud de las RL (LRL) (cm) con el programa ImageJ versión 1.52p.

8.10 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron mínimo tres veces de manera independiente evaluando 20 plántulas por tratamiento. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa STATISTICA 8.0 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 Evaluación de los parámetros de la arquitectura radicular y el nivel de auxinas en plántulas *DR5:uidA* expuestas a *Azospirillum*

Se ha reportado que *A. brasilense* detiene el crecimiento de la RP y aumenta el NRL en plántulas de *Arabidopsis*, en el presente estudio se analizó el efecto de 2.5×10^5 UFC/mL de la bacteria en plántulas *DR5:uidA* de *Arabidopsis*. *A. brasilense* provocó una disminución de la LRP y un incremento del NRL (Fig. 31). El nivel de auxinas en plántulas *DR5:uidA* expuestas a *A. brasilense*, mostró al primer día de exposición, que el marcador se localizó en la ZM, al tercero en el haz vascular de la RP, específicamente en la zona de diferenciación de las RL. Mientras que al quinto día disminuyó en dicha zona y en la ZM de la RP y se observó una redistribución de las auxinas a la ZM de las RL. Al sexto día, desapareció el marcador de la punta de la RP (Fig. 31e).

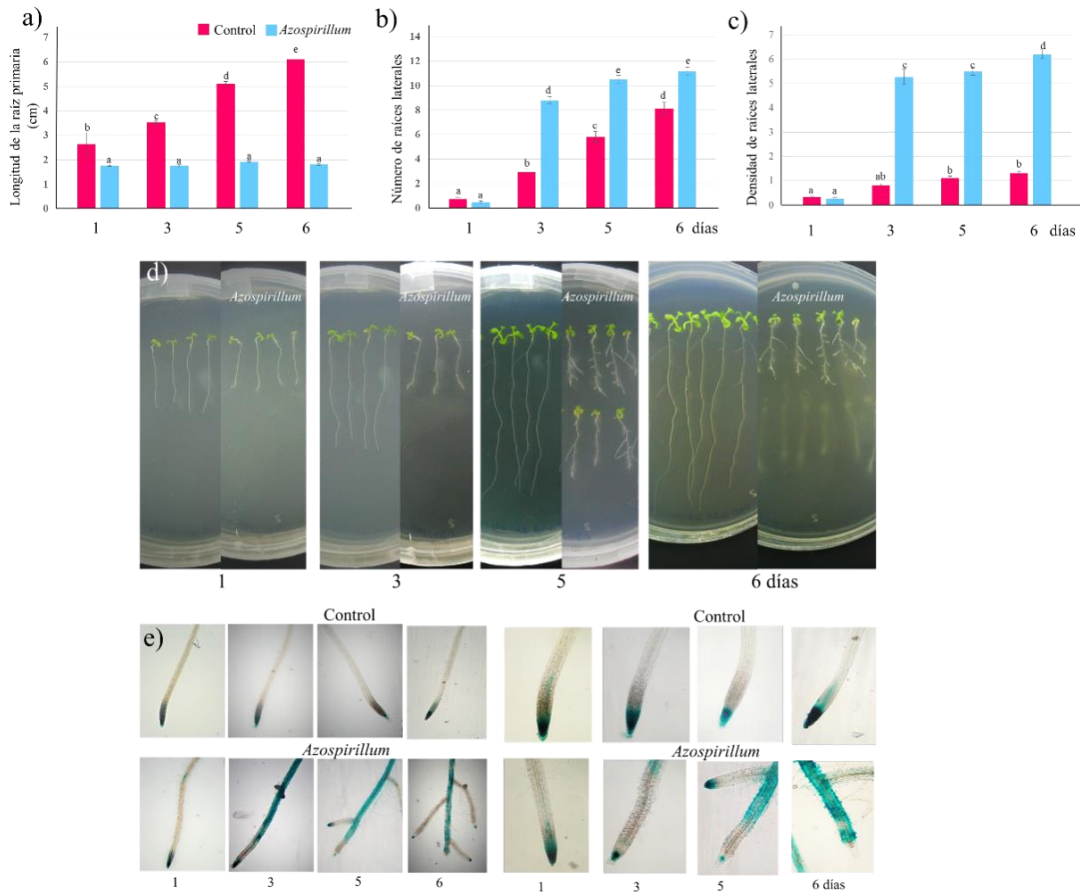


Figura 31. Efecto de *Azospirillum brasilense* sobre la arquitectura radicular y el nivel de auxinas en plántulas *DR5:uidA* de *Arabidopsis*. **a)** Longitud de la raíz primaria de plántulas *DR5:uidA* de 5 dde, expuestas 1, 3, 5 y 6 d a 2.5×10^5 UFC/mL de *Azospirillum*. **b)** Número de raíces laterales. **c)** Densidad de raíces laterales. **d)** Fotografías representativas de las plántulas *DR5:uidA* en medio control e inoculado con *A. brasilense*. **e)** Nivel de auxinas de plántulas *DR5:uidA* control y expuestas durante 1, 3, 5 y 6 d a *A. brasilense* observadas con un aumento de 5 y 10X. 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 ($P \leq 0.05$). Los experimentos fueron repetidos por triplicado con resultados similares.

Como el objetivo de este trabajo consistía en evaluar la participación de TOR en la interacción *Arabidopsis-Azospirillum*, para cumplirlo se llevó a cabo el siguiente experimento donde se utilizaron dos inhibidores de TOR: Torin1 y AZD-8055.

9.2 Efecto de los inhibidores de TOR: Torin1 y AZD-8055 sobre la arquitectura radicular de plántulas de *Arabidopsis*

Actualmente para el estudio de TOR se emplean inhibidores de segunda generación como: Torin1 y AZD-8055, en esta investigación se ensayaron ambos compuestos para evaluar su efecto sobre la AR en plántulas de *Arabidopsis*. Las plántulas *DR5:uidA* de *Arabidopsis* de 5 dde fueron transferidas a medios control y suplementados con 500 nM de Torin1 y 1000 nM de AZD-8055. Torin1 prácticamente no indujo ningún cambio en la LRP, mientras que el AZD-8055 a partir del tercer día provocó una disminución de este parámetro del 31%, 53% y 54% respectivamente (Fig. 32a). Respecto al NRL, Torin1 lo redujo en el quinto y sexto día en 37% y 49% respectivamente, mientras que AZD-8055, mostró sólo una reducción del 13% y 36% (Fig. 32b). En la figura 32d se puede observar que AZD-8055 disminuyó el nivel de auxinas en la punta de la RP.

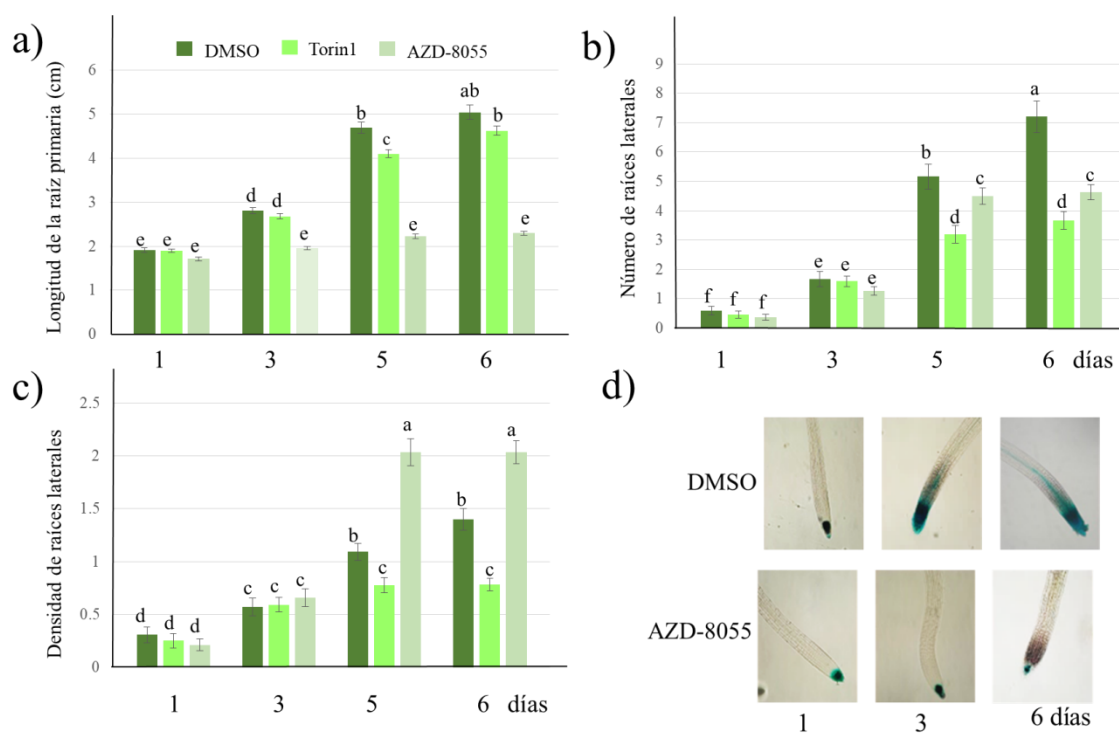


Figura 32. Efecto de Torin1 y AZD-8055 sobre la arquitectura radicular de plántulas de *Arabidopsis*. a) Longitud de la raíz primaria de plántulas *DR5:uidA* de 5 dde, expuestas durante 1, 3, 5 y 6 d a 500 nM de Torin1 y 1000 nM de AZD-8055. b) Número de raíces laterales. c) Densidad de raíces laterales. d) Efecto del AZD-8055 sobre el nivel de auxinas de plántulas expuestas al inhibidor. Los valores representan el promedio de 30 plántulas +/- error estándar. Las letras indican las diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros de la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Los experimentos fueron repetidos por triplicado con resultados similares.

Este experimento mostró que en mayor proporción Torin1 disminuyó el NRL, mientras que AZD-8055 la LRP de plántulas de *Arabidopsis*. Como ambos inhibidores presentaron

efectos diferentes sobre los parámetros de la AR, en el siguiente ensayo se utilizaron las dos moléculas para analizar su efecto durante la interacción *Arabidopsis-Azospirillum*.

9.3 Evaluación de la arquitectura radicular y el nivel de auxinas en plántulas *DR5:uidA* expuestas a *Azospirillum brasilense* y al AZD-8055

Se ha reportado que el crecimiento de la RP de *A. thaliana* depende de TOR (Barrada *et al.*, 2015) y como las plántulas de *Arabidopsis* expuestas a *A. brasilense* mostraron una detención del crecimiento de la PR y un aumento del NRL (Fig. 30a-b), hipotetizamos que en la interacción *Arabidopsis-Azospirillum* participa TOR. Para demostrar si el fenotipo antes mencionado depende de TOR, plántulas *DR5:uidA* fueron expuestas a 1000 nM de AZD-8055, a 2.5×10^5 UFC/mL de *A. brasilense* y a la bacteria más el inhibidor. En todos estos tratamientos se observó una reducción de la LRP en la misma proporción en todos los tiempos ensayados (Fig. 33a), mientras que el NRL disminuyó de manera similar en el tratamiento con la bacteria y con el inhibidor más *Azospirillum* (Fig. 33b). El crecimiento de las RL disminuyó en las plántulas expuestas seis días a la bacteria y al inhibidor juntos, comparado al efecto causado sólo por la exposición a la bacteria (Fig. 33d). En la figura 31e, se puede observar que *A. brasilense* aumentó el marcador de auxinas en la ZD de las RL y que dicho marcador disminuyó en la zona antes mencionada y desapareció de la ZM de la RP de *Arabidopsis* a los seis días de exposición a la bacteria; mientras el inhibidor junto con la bacteria, provocó una disminución del nivel de auxinas respecto al efecto causado por la exposición a *A. brasilense* (Fig. 33f).

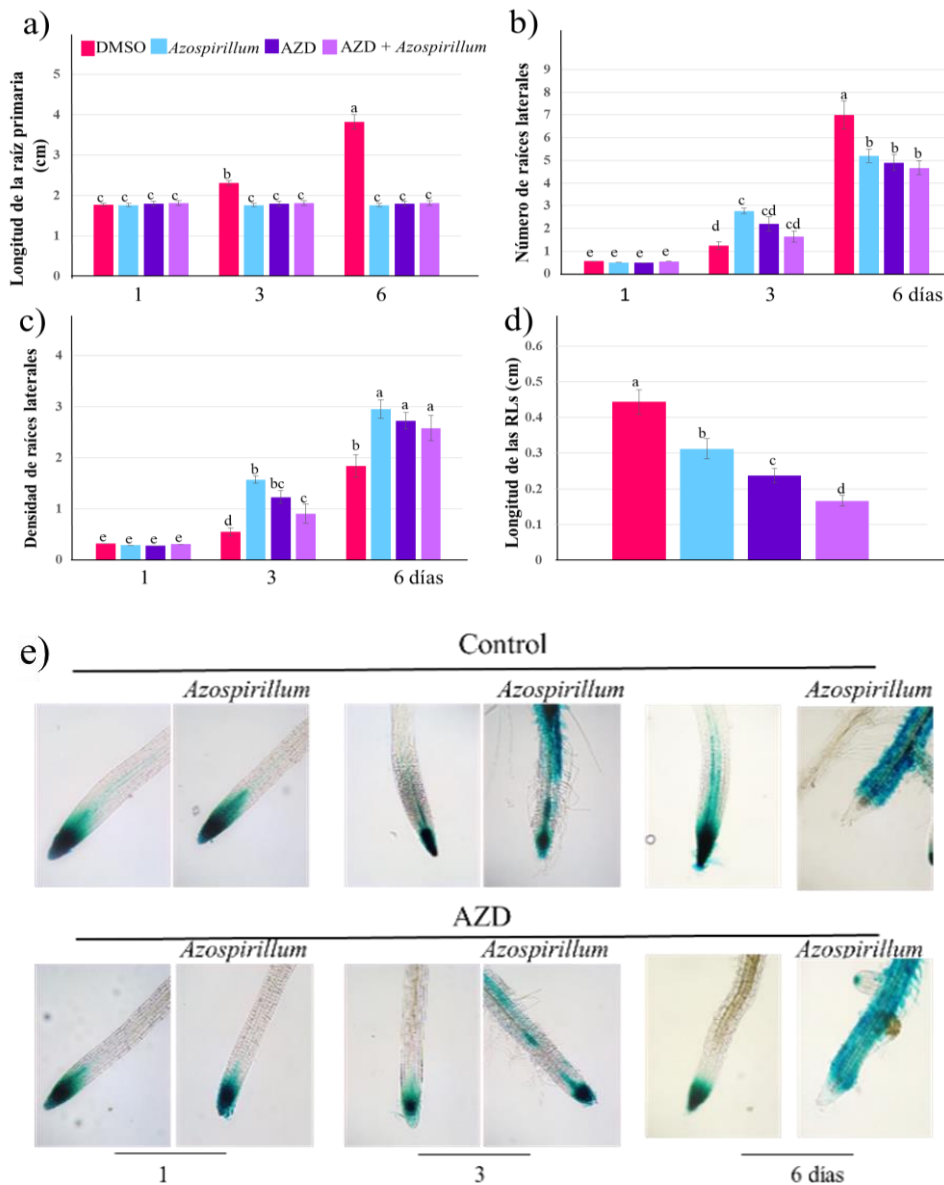


Figura 33. Efecto del AZD-8055 sobre la arquitectura radicular de plántulas *DR5:uidA* expuestas a *Azospirillum brasilense*. a) Longitud de la raíz primaria de plántulas de 5 dde, expuestas 1, 3 y 6 d a 1000 nM de AZD-8055, 2.5×10^5 UFC/mL de *A. brasilense* y a la bacteria más el inhibidor. b) Número de raíces laterales. c) Densidad de raíces laterales. d) Longitud de las raíces laterales de plántulas *DR5:uidA* de 5 dde, expuestas 6 d al inhibidor y a la bacteria. e) Efecto de AZD-8055 y *A. brasilense* sobre el nivel de auxinas de plántulas *DR5:uidA*. Los valores representan el promedio de 30 plántulas +/- error estándar. Las letras indican las diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros de la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Los experimentos fueron repetidos por triplicado con resultados similares.

Así que, este experimento mostró que el efecto de *A. brasilense* sobre la AR de las plántulas de *Arabidopsis* es independiente de TOR y que solamente depende de ésta cinasa, el crecimiento de las RL y el nivel de auxinas de la RP de *Arabidopsis*.

9.4 Evaluación de la arquitectura radicular y el nivel de auxinas en plántulas *DR5:uidA* expuestas a *Azospirillum brasilense* y a Torin1

Posteriormente, se evaluó el efecto de Torin1 sobre la AR de plántulas *DR5:uidA* expuestas a *A. brasilense*. Se puede apreciar en la figura 34a, que la bacteria más Torin1 disminuyeron la LRP en la misma proporción en plántulas expuestas sólo a la bacteria, mientras que el NRL incrementó de la misma forma en los tratamientos antes mencionados (Fig. 34b). En presencia de este inhibidor al igual que con AZD-8055, se observó que el crecimiento de las RL inducido por la bacteria se encuentra comprometido en presencia del inhibidor (Fig. 34d). Además, se puede apreciar que el nivel de auxinas en plántulas expuestas a Torin1 más la bacteria disminuyó respecto al efecto causado sólo por la bacteria (Fig. 34e).

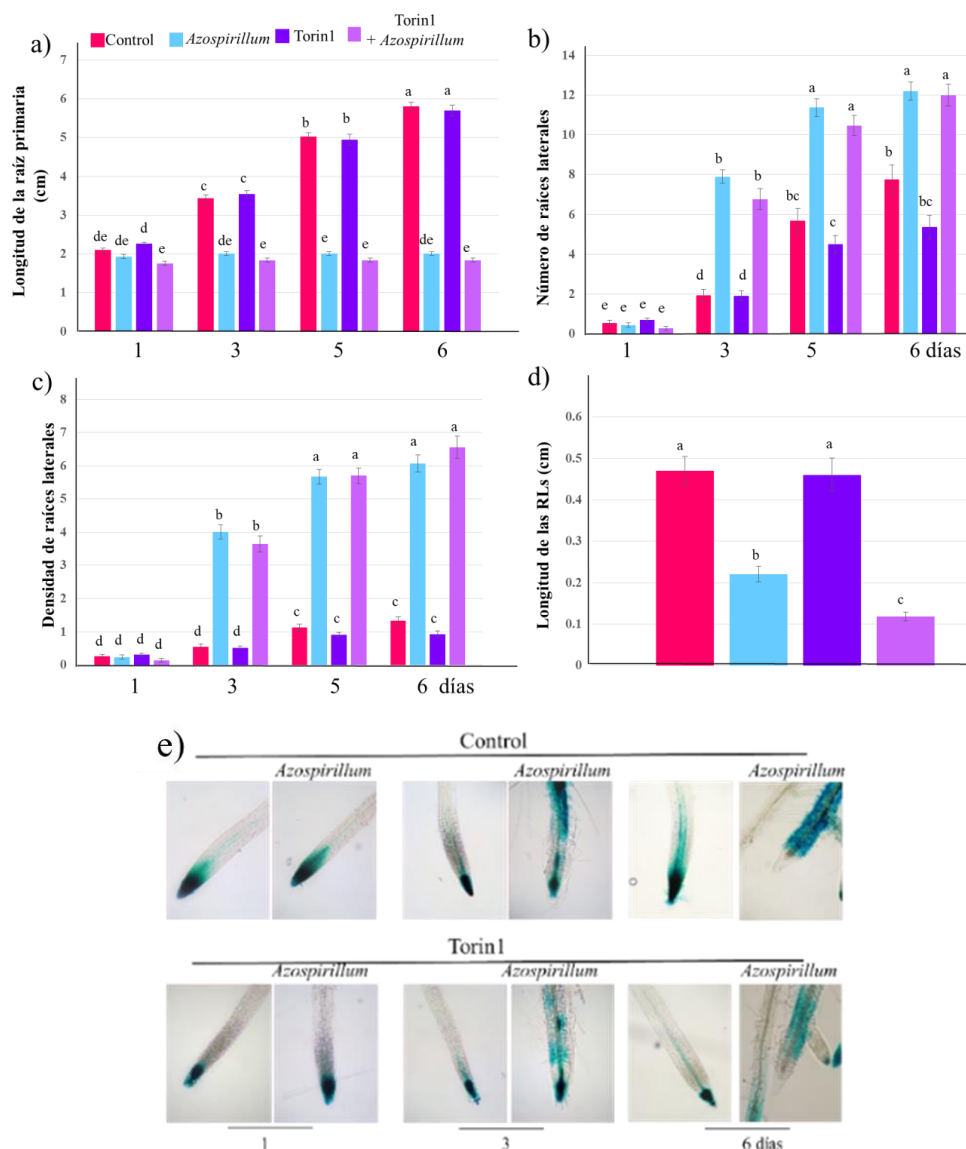


Figura 34. Efecto de Torin1 sobre la arquitectura radicular de plántulas *DR5:uidA* expuestas a *Azospirillum*. a) Longitud de la RP de plántulas de 5 dde, expuestas 1, 3 y 6 días a 500 nM de Torin1 y 2.5×10^5 UFC/mL de *Azospirillum*. b) Número de raíces laterales. c) Densidad y d) Longitud de las raíces laterales de plántulas de 5 dde, expuestas 6 días al inhibidor y a la bacteria. e) Efecto del inhibidor y de *Azospirillum* sobre el nivel de auxinas de plántulas. 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 ($P < 0.05$). Los experimentos fueron repetidos por triplicado con resultados similares.

Así que la estrategia farmacológica con ambos inhibidores mostró que el efecto de *A. brasilense* sobre los parámetros de la AR de las plántulas de *Arabidopsis* no depende de TOR y que únicamente esta cinasa parece estar involucrada en el crecimiento de las RL (Fig. 33d y 34d). Para corroborar el efecto de la inhibición de TOR, a continuación se utilizó una estrategia genética, haciendo uso de la mutante condicionada a la presencia de estradiol *tor-es1DR5:uidA* de *Arabidopsis*.

9.5 Efecto de *Azospirillumbrasilense* sobre la arquitectura radicular y el nivel de auxinas en plántulas *tor-es1 DR5:uidA*

Las plántulas *tor-es1 DR5:uidA* de 5 dde fueron transferidas a medios de cultivo sin y suplementados con 10 μ M de estradiol, con 2.5×10^5 UFC/mL de *A. brasilense* y con estradiol más la bacteria. El material se incubó durante uno, tres, y seis días y se evaluaron los parámetros de la AR. En la figura 35a, se puede apreciar que los tratamientos con *A. brasilense* y con estradiol, ambos reducen la LRP en todos los tiempos ensayados (Fig. 35a); en tanto que *A. brasilense* incremento el NRL a partir del tercer día en un 260%, 183% y 140% respectivamente. Este parámetro en presencia de estradiol más la bacteria incrementó al tercer, quinto y sexto día en 169%, 191% y 174%. Haciendo una comparación entre los tratamientos en presencia de *A. brasilense* y la bacteria más estradiol (barra azul respecto a la lila), el NRL se redujó a partir del tercer día de interacción en un 25% (Fig. 35b). También se observó que el crecimiento de las RL se redujó drásticamente (45%) en este último tratamiento, respecto a la exposición solo con *A. brasilense* (Fig. 35d). Por otra parte, el marcador de auxina disminuyó fuertemente en la ZD de las RL, en las plántulas expuestas al estradiol más la bacteria respecto al observado solo en presencia de la bacteria (Fig. 35e). Cabe mencionar que dicho marcador no mostró cambios en la punta de las RP en todos los tratamientos analizados (datos no mostrados).

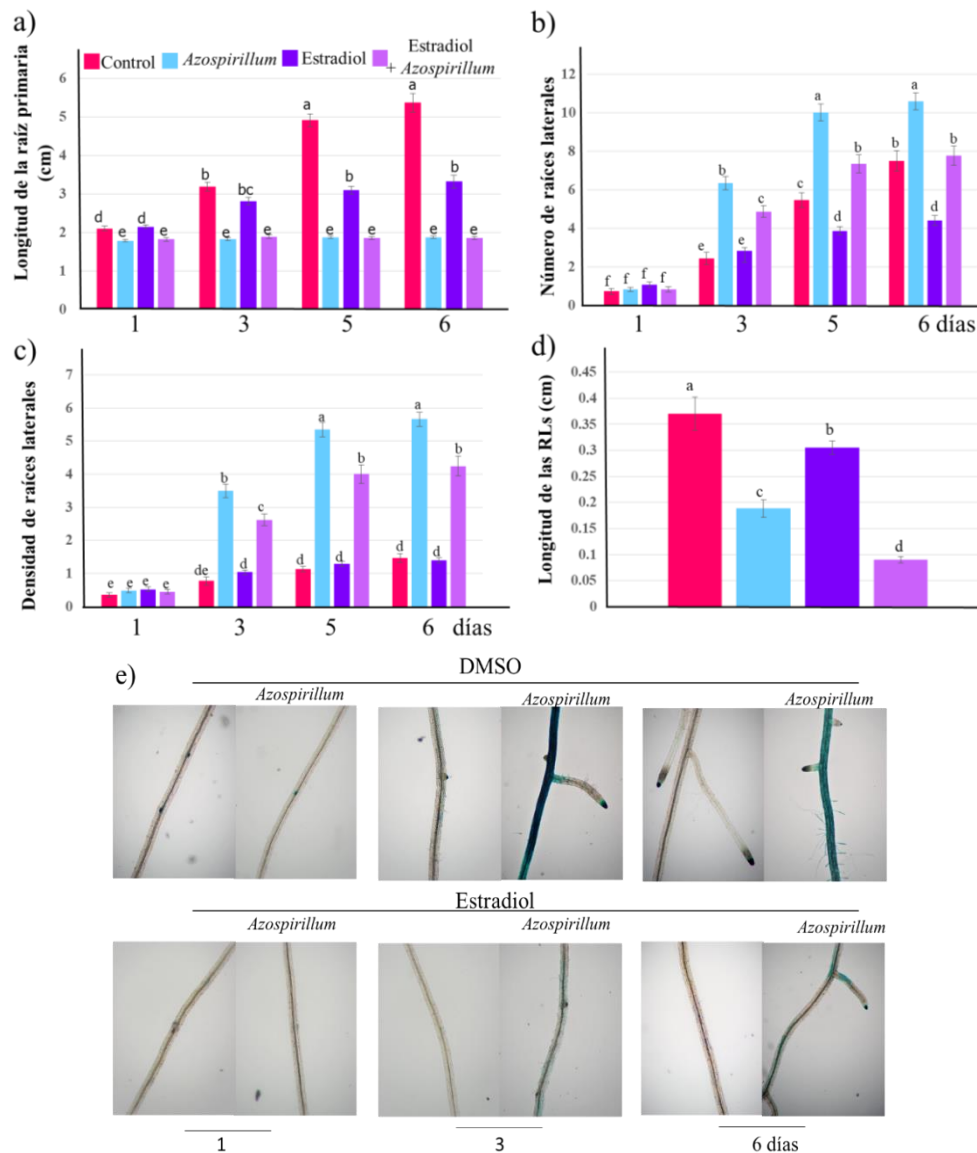


Figura 35. Efecto del estradiol sobre la arquitectura radicular y el nivel de auxinas de plántulas *tor-es1 DR5:uidA* expuestas a *Azospirillum*. a) Longitud de la raíz primaria de plántulas de 5 dde, expuestas durante 1, 3 y 6 días a 10 μ M de estradiol y 2.5×10^5 UFC/mL de *A. brasilense*. b) Número de raíces laterales. c) Densidad de raíces laterales. d) Longitud de las raíces laterales de plántulas de 5 dde, expuestas durante 6 d al estradiol y a *A. brasilense*. e) Efecto del estradiol y de *A. brasilense* sobre el nivel de auxinas de plántulas. 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 ($P \leq 0.05$). Los experimentos fueron repetidos por triplicado con resultados similares.

Haciendo uso de la mutante de *Arabidopsis tor-es1 DR5:uidA*, los resultados mostraron que tanto el incremento del NRL como el crecimiento de estas dependen de TOR, mientras que en presencia de los inhibidores de TOR (Torin1 y AZD-8055), las plántulas solo presentaron una reducción en la LRL, lo que muestra que ambas estrategias no presentan el mismo efecto sobre la AR.

Por otro lado, como en nuestro grupo de trabajo se ha observado que para que *A. brasilense* estimule el NRL requiere activo el PAT (Arreola-Rivera, 2018); a

continuación se evaluó la participación de TOR sobre dicho transporte en presencia del inhibidor del PAT, el NPA sobre el desarrollo de la AR de plántulas *tor-es1 DR5:uidA* de *Arabidopsis* expuestas a *A. brasilense*.

9.6 Efecto del NPA sobre los cambios de la arquitectura radicular en plántulas *tor-es1 DR5:uidA* expuestas a *Azospirillum brasilense*

El ácido N-1-naftiltalámico (NPA), es el inhibidor de eflujo de auxinas mejor caracterizado, el cual provoca un arresto en la elongación del hipocotilo en *Arabidopsis* (Ma y Robert, 2013). El NPA actúa como un inhibidor específico del AIA y tiene como blanco principal a los transportadores de eflujo tipo ABCB (Bailly *et al.*, 2008). Esta molécula ha sido ampliamente utilizada como una valiosa herramienta en la investigación de la función del PAT y su efecto sobre el desarrollo vegetal. Por otro lado, en nuestro grupo de trabajo se ha mostrado que *A. brasilense* incrementa el NRL en plántulas de *A. thaliana* de manera dependiente del PAT (Fig. 27c). Por lo antes mencionado, en la presente investigación se evaluó la posible participación de TOR sobre dicho transporte, para lo cual las plántulas *tor-es1 DR5:uidA* de 5 dde fueron transferidas a medios de cultivo sin y suplementados con 10 μ M de estradiol, 1 μ M de NPA más 2.5×10^5 UFC/mL de *A. brasilense*. El material se incubó durante uno, tres y seis días y se evaluaron los parámetros de la AR. En la figura 36a, se puede apreciar que el tratamiento con *A. brasilense* junto con el estradiol y el NPA redujeron la LRP en todos los tiempos ensayados. Las plántulas en presencia del NPA más la bacteria disminuyeron el NRL al tercero y sexto día en 50% y 37%, respectivamente. Sin embargo, en las plántulas expuestas al NPA, a *A. brasilense* y a estradiol, se observó una reducción del NRL solamente en un 25% al tercer día de interacción (Fig. 36b). En tanto, que el NPA también inhibió el crecimiento de las RL, y en ausencia de TOR dicho parámetro no mostró ningún cambio (Fig. 36d). Por otra parte, a los tres días se observó que las auxinas aumentaron su nivel en la ZD de las RL en plántulas expuestas a *A. brasilense*, mientras que al sexto día, disminuyó en la zona antes mencionada y desapareció de la ZM de la RP. En las plantas tratadas con NPA se localizó en la ZM de la RP conforme transcurrió el tiempo, mientras que en el tratamiento con el inhibidor más la bacteria a partir del tercer día se redujo el nivel de auxinas en la ZD de las RLs y al sexto desapareció de la ZM de la RP. Al exponer las plántulas a estradiol, NPA y a *A. brasilense*, se pudo apreciar que las auxinas disminuyeron a partir del tercer día en la ZD de las RL, y al sexto desaparecieron de la ZM de la RP en plántulas de *A. thaliana* (Fig. 36f).

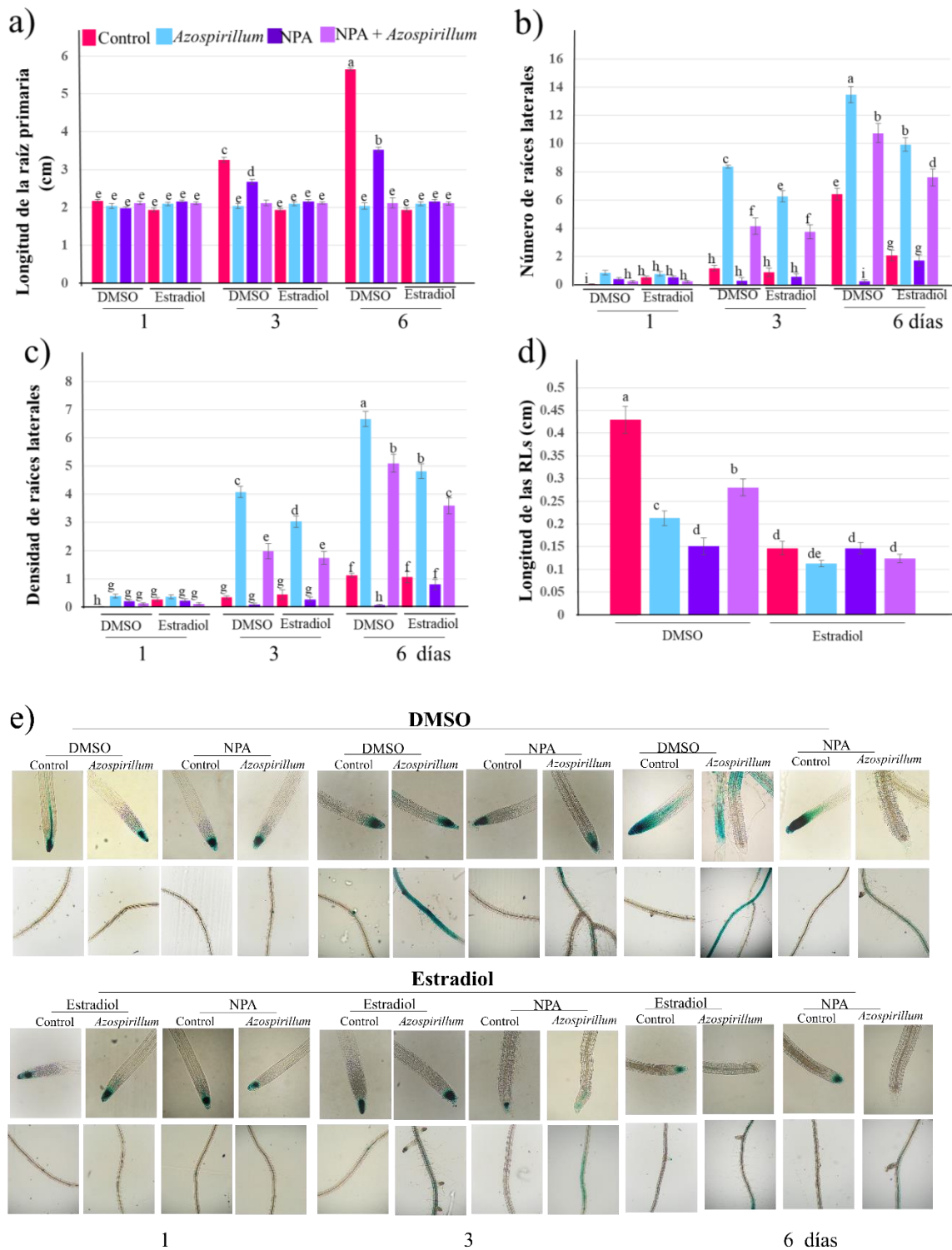


Figura 36. Efecto del NPA sobre la arquitectura radicular y el nivel de auxinas de plántulas *tor-es1 DR5:uid Aexpuestas a Azospirillum*. **a)** Longitud de la raíz primaria de plántulas de 5 dde, expuestas durante 1, 3 y 6 d a 10 μ M de estradiol, 1 μ M de NPA y 2.5×10^5 UFC/mL de *A. brasilense*. **b)** Número de raíces laterales. **c)** Densidad de raíces laterales. **d)** Longitud de las raíces laterales de plántulas de 11 dde, expuestas durante 6 d al estradiol, NPA y a *A. brasilense*. **e)** Efecto del estradiol y de *A. brasilense* sobre el nivel de auxinas de plántulas. 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 ($P \leq 0.05$). Los experimentos fueron repetidos por triplicado con resultados similares.

Los resultados de los experimentos mostrados en la figura 36, sugieren que TOR podría estar participando en la regulación del PAT durante la interacción *Arabidopsis-Azospirillum*, debido a que en las plántulas expuestas al NPA y al estradiol, la bacteria no incrementó el NRL en la misma proporción que el control, además se detuvo el crecimiento de las RL.

Respecto a la regulación del PAT por moléculas endógenas, se sabe que una de las funciones de los flavonoides consiste en regular dicho transporte, por lo que en el siguiente experimento, analizamos el efecto en la mutante *transparent testa4 (tt4)* de *Arabidopsis*, que tiene una menor concentración de flavonoides sobre el sistema radicular de plántulas de esta línea expuesta a *A. brasilense*.

9.7 Efecto de *Azospirillum* sobre la arquitectura radicular de plántulas *tt4* de *Arabidopsis* expuestas a *Azospirillum*

Los flavonoides (flavonoles, antocianinas y proantocianidinas), están presentes principalmente como pigmentos en testa de las semillas y flores, y estos compuestos llevan a cabo una gran variedad de funciones biológicas, como protección contra microbios y luz ultravioleta, defensa contra el estrés ambiental y alelopatía, además de regular el transporte de auxinas.

Los flavonoides afectan la expresión (Peer *et al.*, 2004) y la localización de los PIN (Santelia *et al.*, 2008) y el ciclo de las proteínas PIN en las vesículas endosómicas (Geldner *et al.*, 2001). Además, ellos modifican la actividad de los transportadores de auxina tipo ABCB (Baily *et al.*, 2008) y modulan el gravitropismo de la raíz (Lotkowska *et al.*, 2015).

Los miembros de la familia TRANSPARENT TESTA (TT) son enzimas que participan en las vías de biosíntesis de flavonoides en *Arabidopsis*, entre ellas se encuentra TT4 que corresponde a una CHALCONE SYNTHASE (CHS), que cataliza el primer paso de la biosíntesis de flavonoides para producir naringenina chalcona, un precursor común de varios flavonoides (Pollastri y Tattini, 2011). La mutación de *TT4* a menudo genera semillas de color amarillo pálido, como resultado de la deficiencia de flavonoides (Burbulis *et al.*, 1996).

Así que en el presente estudio, se analizó el efecto de *A. brasilense* sobre la AR en plántulas *tt4* de *Arabidopsis*, debido a que esta mutante al tener disminuida la concentración de flavonoides teóricamente presentaría un mayor PAT (Brown *et al.*, 2001). Para ello, plántulas *tt4* de 5 dde fueron transferidas a medios de cultivos control y suplementados con 2.5×10^5 UFC/mL de bacteria y se incubaron durante uno, tres y seis días. En la figura 37, se puede observar que en las plántulas Ler y *tt4* de *Arabidopsis*, *A. brasilense* arrestó el crecimiento de la RP a partir del primer día de exposición. Por otra parte, la bacteria incrementó el NRL en *tt4* a partir del tercer día, en un 737% y 121%, respectivamente, respecto al efecto que causó *A. brasilense* en la línea Ler (Fig. 37). Cabe resaltar que la RP de las plántulas *tt4* control mostraron un gravitropismo, efecto que fue revertido en las plántulas expuestas a *A. brasilense*.

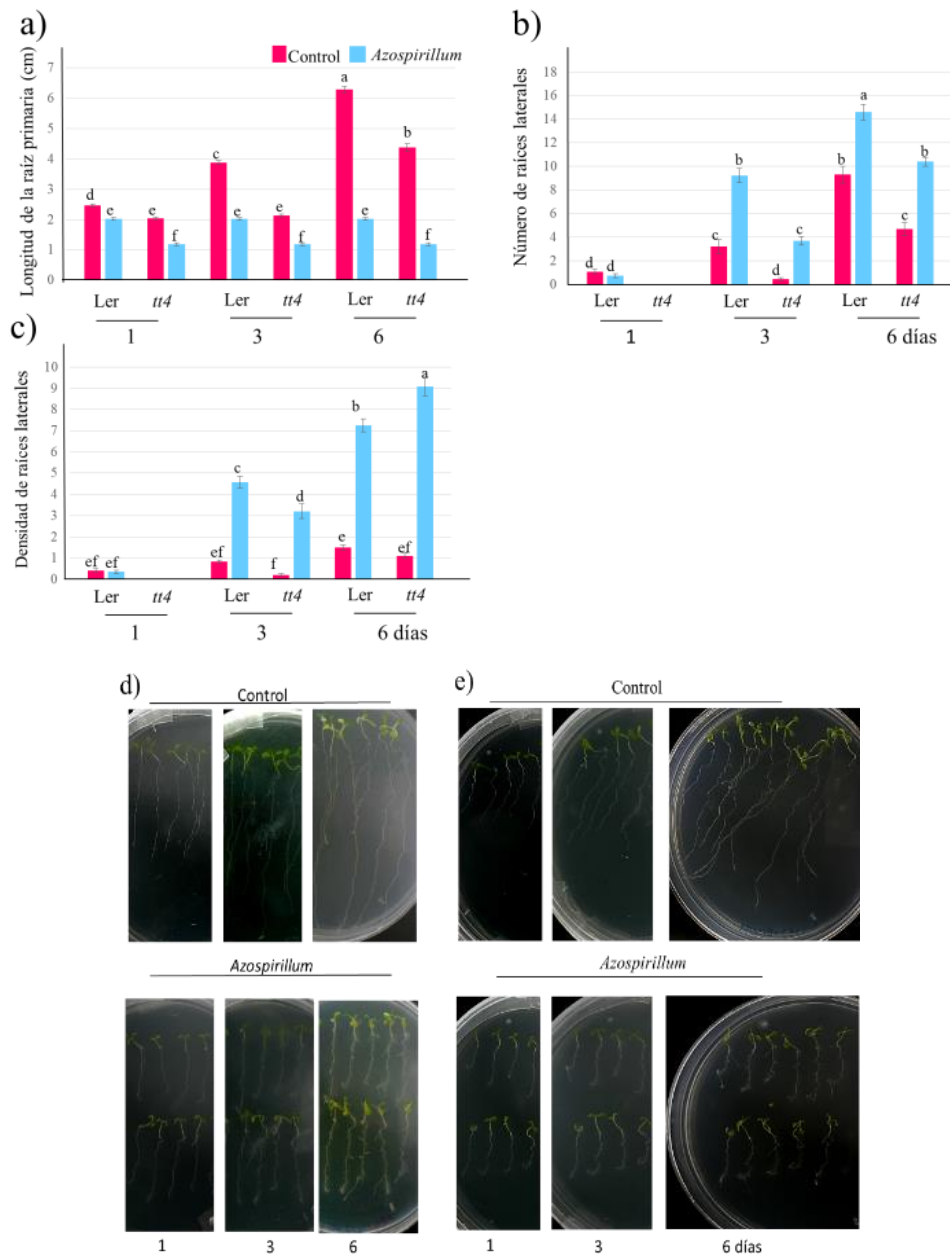


Figura 37. Efecto de *Azospirillum* sobre la arquitectura radicular de plántulas *tt4* de *Arabidopsis*. a) Longitud de la raíz primaria de plántulas de 5 dde, expuestas 1, 3 y 6 d a 2.5×10^5 UFC/mL de *A. brasilense*. b) Número de raíces laterales. c) Densidad de raíces laterales. d) Fotografías representativas de las plántulas Ler de *A. thaliana*. e) Fotografías representativas de las plántulas *tt4* de *A. thaliana*. Las letras indican las diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros de la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Los experimentos fueron repetidos por triplicado con resultados similares.

Con el presente experimento, se mostró que en plántulas *tt4* de *Arabidopsis*, las cuales tienen un PAT acelerado, *A. brasilense* incrementó el NRL en un 737% al tercer día de interacción, mientras que la disminución en la LRP es independiente de dicho transporte (Fig. 37 b). Como se mencionó anteriormente además del PAT, estudios en nuestro grupo de trabajo mostraron que algunas de las proteínas que participan en la regulación de dicho transporte como: PGP1, AXR4-1 y BEN2 parecen estar involucradas en el incremento del NRL inducido por *A. brasilense* en plántulas de *Arabidopsis* (Fig. 27a-b). Bajo esta premisa, se analizó si TOR altera este comportamiento en las plántulas mutante de las tres

líneas antes mencionadas, para lo cual se utilizaron las mutantes expuestas por diferentes tiempos a la bacteria y a un inhibidor de TOR.

9.8 Efecto del AZD-8055 sobre la arquitectura radicular de plántulas *pgp1*, *axr4-1* y *ben2* expuestas a *Azospirillum brasilense*

La proteína AXR4-1 está involucrada en la localización del transportador de influjo de auxinas AUX/LAX, BEN2 en la del transportador PIN, mientras que PGP1 miembro de la familia de proteínas ABC, la cual funciona principalmente en el mantenimiento de la corriente del transporte de auxina a larga distancia y en el movimiento fuera de los tejidos apicales (Bandyopadhyay *et al.*, 2007). En 2018, Arreola-Rivera, reportó que PGP1, AXR4-1 y BEN2 participan en el efecto de *A. brasilense*, sobre el aumento del NRL en plántulas de *Arabidopsis*. En el presente trabajo, utilizamos las plántulas *pgp1*, *axr4-1* y *ben2* de *Arabidopsis* de 5 dde, las cuales fueron transferidas a medio de cultivo sin y con 1000 nM de AZD añadiendo 2.5×10^5 UFC/mL de bacteria, el material se incubó durante uno, tres y seis días, y se evaluaron los parámetros de la AR de las plántulas de *Arabidopsis*. En la figura 38 Aa, Ba y Ca se puede observar, que la bacteria disminuyó la LRP de la misma manera que en el tratamiento con *A. brasilense* más el inhibidor en todas las líneas ensayadas, al igual que el incremento del NRL (Fig. 38 Ab, Bb y Cb). Solamente el crecimiento de las RL se redujo en este tratamiento (Fig. 38 Ad, Bd y Cd).

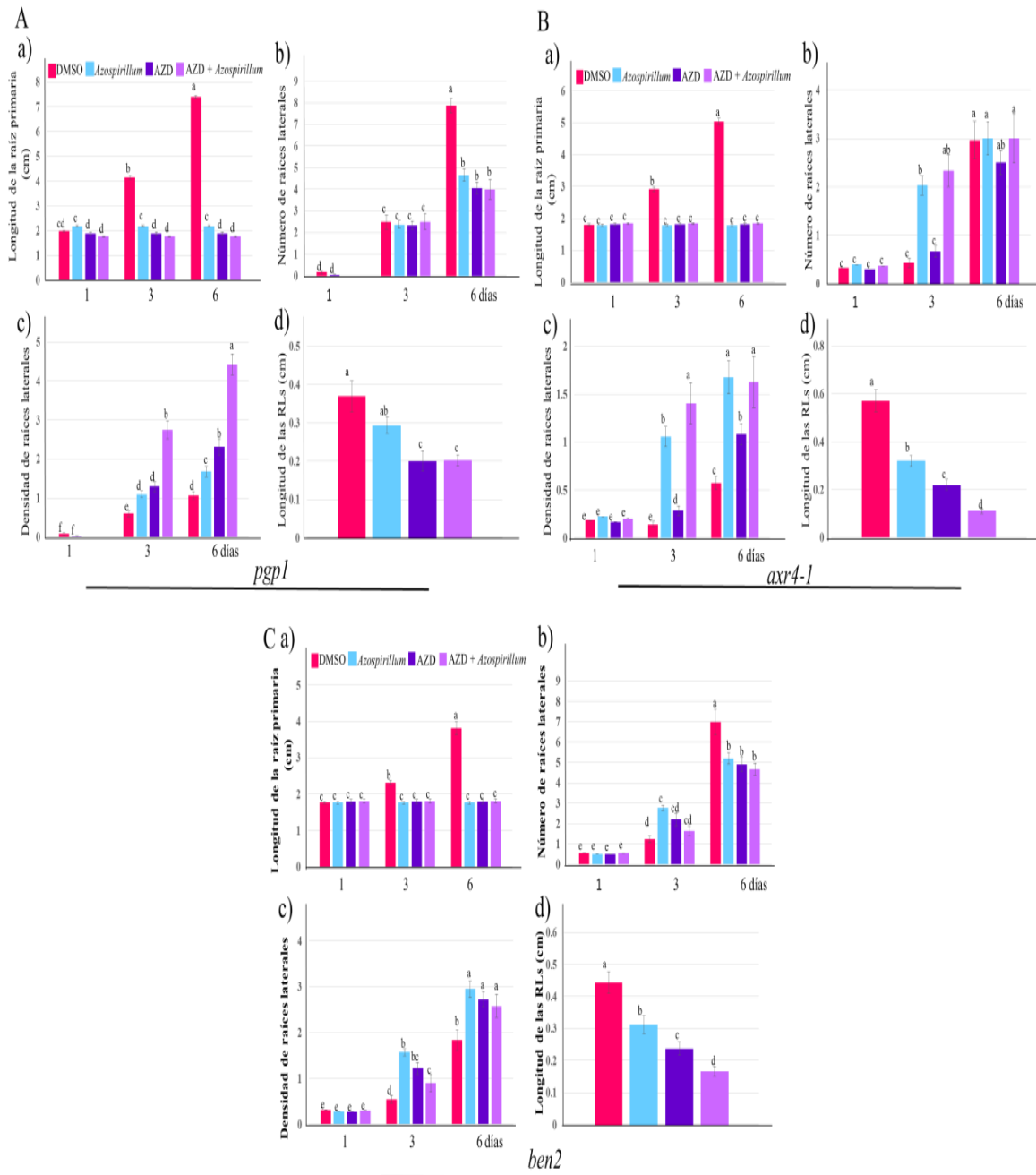


Figura 38. Efecto del AZD-8055 sobre la arquitectura radicular de plántulas *pgp1*, *axr4-1* y *ben2* expuestas a *Azospirillum*. A. a) Longitud de la raíz primaria de plántulas *pgp1* de 5 dde, expuestas durante 1, 3 y 6 d a 1000 nM de AZD-8055 y 2.5×10^5 UFC/mL de *A. brasilense*. b) Número de raíces laterales. c) Densidad de raíces laterales. d) Longitud de las raíces laterales de plántulas de 11 dde. B. a) Longitud de la raíz primaria de plántulas *axr4-1* de 5 dde, expuestas durante 1, 3 y 6 d a 1000 nM de AZD-8055 y 2.5×10^5 UFC/mL de *A. brasilense*. b) Número de raíces laterales. c) Densidad de raíces laterales. d) Longitud de las raíces laterales de plántulas de 11 dde. C. a) Longitud de la raíz primaria de plántulas *ben2* de 5 dde, expuestas durante 1, 3 y 6 d a 1000 nM de AZD-8055 y 2.5×10^5 UFC/mL de *A. brasilense*. b) Número de raíces laterales. c) Densidad de raíces laterales. d) Longitud de las raíces laterales de plántulas de 11 dde. 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 ($P \leq 0.05$). Los experimentos fueron repetidos por triplicado con resultados similares.

Estos resultados mostraron que las plántulas de las mutantes *pgp1*, *axr4-1* y *ben2* en presencia del inhibidor de TOR, tienen el mismo comportamiento sobre el NRL que el

experimento control durante la interacción *Arabidopsis*-*Azospirillum*, es decir, parece ser que TOR no participa en este efecto y que solamente la cinasa en estas líneas regula el crecimiento de las RL (Fig. 38A, B y C).

Por otra parte, como se sabe que el crecimiento de las RL al igual que de la RP de *Arabidopsis* depende tanto de la proliferación como de la elongación celular, para analizar cuál de los dos procesos pudiera estar alterando en la disminución del crecimiento de las RL al inhibir a TOR en plántulas de *A. thaliana* se utilizaron las líneas reporteras *CyB1:uidA* y *Exp7:uidA* expuestas a *A. brasilense* y a 1000 nM de AZD-8055. La primera línea, permitirá analizar si la alteración en la división celular está involucrada, mientras que con la línea *Exp7:uidA* se determinara la alteración en la elongación celular.

9.9 Efecto del AZD-8055 sobre la división celular de los meristemas de las raíces laterales de *Arabidopsis* expuestas a *Azospirillum*

El arresto en el crecimiento de las RL de plántulas expuestas a *A. brasilense* y al AZD-8055 podría deberse a una alteración en la proliferación celular. Para probar esta hipótesis, las plántulas de la línea reportera *CyB1:uidA* de 5 dde se transfirieron a los medios sin y suplementados con 2.5×10^5 UFC/mL de bacteria y 1000 nM del inhibidor donde se incubaron uno, tres y seis días. Al tercer día de exposición, el marcador *CyB1:uidA* en las plántulas expuestas a la bacteria se expresó en el meristemo de la raíz lateral de forma similar al control, en tanto que en las plántulas expuestas a *A. brasilense* y AZD-8055, se observó una disminución en dicho marcador al tercer día y una desaparición al sexto día de exposición (Fig. 39).

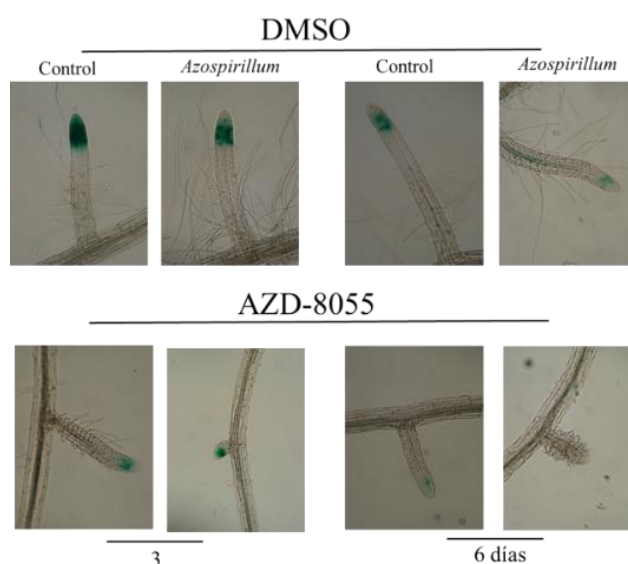


Figura 39. *Azospirillum brasilense* Sp245 y AZD-8055 alteran la expresión de *CyB1:uidA* en las raíces laterales de *Arabidopsis*. Plántulas de *Arabidopsis* *CyB1:uidA* de 5 dde transferidas a medios control, suplementados con 2.5×10^5 UFC/mL de *A. brasilense* y 1000 nM de AZD-8055, se incubaron durante 1, 3 y 6 d. Se muestran las fotografías representativas tomadas con un objetivo 10X, de las raíces laterales de las plántulas en medio control, inoculado con *A. brasilense*, AZD-8055 y juntos el inhibidor más la bacteria.

Como se puede observar en la figura 39, la inhibición de TOR disminuyó la expresión de *CyB1:uidA* en las RL de plántulas de *Arabidopsis*, lo que sugiere que TOR participa en la regulación de la división celular en los meristemas de las RL de plántulas de *Arabidopsis* expuestas a *A. brasilense*.

9.10 Efecto del AZD-8055 sobre la elongación celular de las raíces laterales de plántulas de *Arabidopsis* expuestas a *Azospirillum*

El arresto en el crecimiento de las raíces laterales de plántulas de *Arabidopsis* expuestas al AZD-8055 y a *A. brasilense* también podría deberse a una alteración en la elongación celular. Para demostrar esto, se utilizaron plántulas de la línea *Exp7:uidA* de *Arabidopsis* que marcan específicamente la zona de diferenciación de pelos radiculares (Cho-Cosgrove, 2002). Plántulas de 5 dde se transfirieron a medios sin y suplementados con 2.5×10^5 UFC/mL de *A. brasilense* y 1000 nM de AZD-8055 donde se incubaron uno, tres y seis días. En la figura 40, podemos observar que el marcador se expresa en las plántulas control en la ZD de los pelos radiculares y debajo de esta se presenta la ZE, en el tratamiento con la bacteria, la ZE disminuyó a partir del tercer día respecto al control, mientras que en presencia del AZD-8055, dicha zona desaparece completamente durante la interacción con la bacteria.

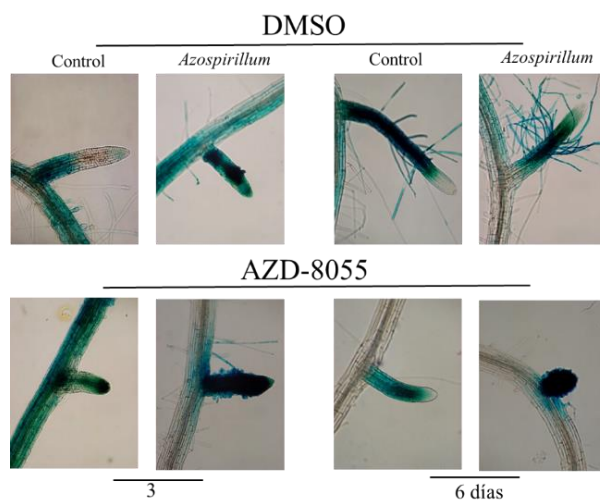


Figura 40. *Azospirillum brasilense* Sp245 y AZD-8055 alteran la expresión de *Exp7:uidA* en la raíz lateral de *Arabidopsis*. Plántulas de *Arabidopsis Exp7:uidA* de 5 dde transferidas a medios control, suplementado con 2.5×10^5 UFC/mL de *A. brasilense* y 1000 nM de AZD-8055, se incubaron durante 1, 3 y 6 d. Se muestran las fotografías representativas de las raíces laterales de las plántulas en medio control, inoculado con *Azospirillum*, AZD-8055 y el inhibidor con la bacteria.

Los resultados con las líneas reporteras *CyB1:uidA* y *Exp7:uidA* mostraron que la inhibición de TOR disminuyó el crecimiento de las RL de *Arabidopsis*, afectando tanto la división celular como la elongación en plántulas de *Arabidopsis* expuestas a *A. brasilense*.

9.11 Efecto de diferentes concentraciones de AIA sobre los parámetros de la arquitectura radicular de plántulas *DR5:uidA*

Con este experimento, las plántulas *DR5:uidA* de 5 dde transferidas a los medios de cultivo MS 0.2X suplementados con 12.5, 25, 50, 100 y 200 nM de AIA; incubado durante uno, tres y seis días. Se puede observar en la figura 45, que solamente al del tercer día de exposición, todas las concentraciones de AIA disminuyeron la LRP e incrementaron el NRL y que este último parámetro se redujó a los 6 días. Mientras que el crecimiento de las RL fue dosis dependiente del AIA. Respecto al nivel de auxinas, no se observaron cambios en las plántulas crecidas en las diferentes concentraciones de AIA (Fig. 41 f-g).

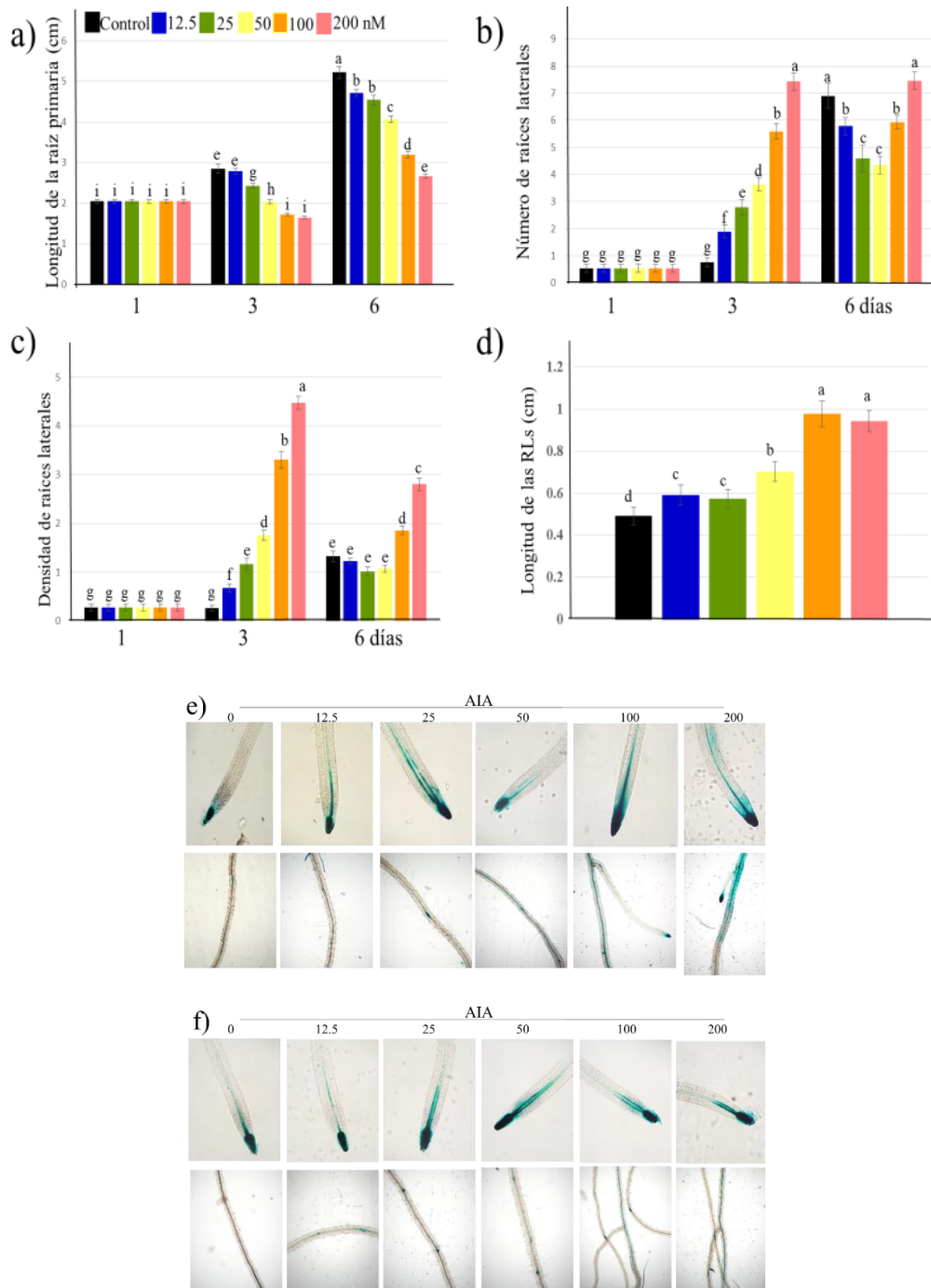


Figura 41. Efecto de diferentes concentraciones del AIA sobre el sistema radicular de plántulas *DR5:uidA*. **a)** Longitud de la raíz primaria de plántulas de 5 dde, expuestas 1, 3 y 6 días a 12.5, 25, 50 y 100 nM de AIA. **b)** Número de raíces laterales. **c)** Densidad de raíces laterales. **d)** Longitud de las raíces laterales de plántulas de 11 dde. **e)** Fotografías representativas del nivel de auxinas de plántulas *DR5:uidA* expuestas durante 3 d (10 y 5X). **f)** Fotografías representativas del nivel de auxinas de plántulas *tor-es1 DR5:uidA* expuestas durante 6 días (10 y 5X). Las letras indican las diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros de la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Los experimentos fueron repetidos por triplicado con resultados similares.

Para comparar el efecto de diferentes concentraciones de inoculación de *A. brasilense*, respecto a distintas concentraciones del AIA se realizó el siguiente experimento:

9.12 Efecto de diferentes concentraciones de *Azospirillum* sobre la arquitectura radicular de plántulas *DR5:uidA*

Para determinar si el AIA exógeno induce el mismo fenotipo causado por *A. brasilense*, en el presente estudio se analizaron diferentes concentraciones de bacteria. Las plántulas *DR5:uidA* de 5 dde fueron transferidas a medio suplementado con 2.5×10^1 , 2.5×10^3 y 2.5×10^5 UFC/mL de *A. brasilense*, el material se incubó durante uno, tres, cinco y seis días de exposición a la bacteria. En todas las concentraciones de *A. brasilense* ensayadas, se observó una reducción en la LRP, excepto a 2.5×10^1 UFC/mL (Fig. 42a), un incremento del NRL (Fig. 42b), y una reducción del crecimiento de las RL (Fig. 42d). En la figura 42e, se aprecia que el marcador de auxinas incrementó de manera dosis dependiente, excepto en 2.5×10^5 donde desapareció de la ZM de la RP.

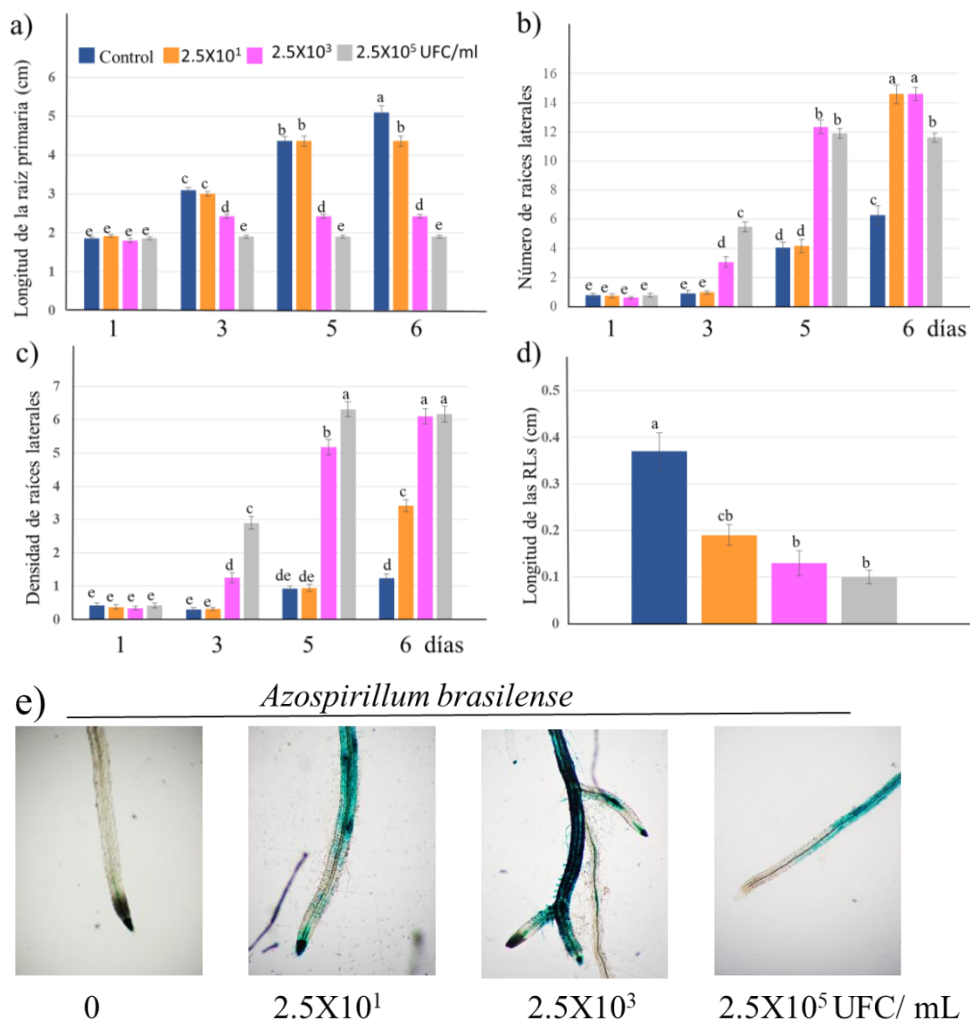


Figura 42. Efecto de diferentes concentraciones de *Azospirillum brasilense* sobre la arquitectura radicular de plántulas *DR5:uidA* de 11 dde. **a)** Longitud de la raíz primaria de plántulas de 5 dde, expuestas 1, 3, 5 y 6 d a 2.5×10^1 , 2.5×10^3 y 2.5×10^5 UFC/mL de *A. brasilense*. **b)** Número de raíces laterales. **c)** Densidad de raíces laterales. **d)** Longitud de las raíces laterales de plántulas de 11 dde. **e)** Nivel de auxinas de plántulas *DR5:uidA* expuestas durante seis d a *A. brasilense*. Las letras indican las diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros de la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Los experimentos fueron repetidos por triplicado con resultados similares.

En las figuras 41 y 42, se muestra en las plántulas de *Arabidopsis* expuestas durante tres días a diferentes concentraciones de AIA y de *A. brasilense*, una reducción en la LRP y un incremento del NRL; mientras que a los seis días las diferentes concentraciones del AIA redujeron ambos parámetros, en tanto que en los experimentos con la bacteria provocaron un incremento del NRL.

9. 13 Evaluación de la arquitectura radicular de plántulas de semillas sembradas directamente sobre el medio de cultivo y expuestas a diferentes concentraciones de *Azospirillum brasilense*.

A diferencia del resto de los experimentos antes mencionados, este se realizó sembrando las semillas directamente sobre los medios MS 0.2X suplementados con diferentes concentraciones de *A. brasilense*, con la finalidad de analizar el comportamiento de la bacteria durante todo el desarrollo de la plántula de *Arabidopsis* desde el inicio del proceso. En plántulas de siete y catorce dde en todas las concentraciones de la bacteria ensayadas, se presentó una disminución en la LRP y un incremento del NRL en plántulas de siete dde y una disminución en las de catorce dde (Fig. 43). En la figura 43 f, se puede observar en las plántulas de siete dde un incremento en el marcador de auxinas en el haz vascular de la ZD de las RL y en los meristemas de las RL en todas las concentraciones de *A. brasilense* ensayadas, que este marcador se redujó en plántulas de catorce dde en las zonas antes mencionadas (Fig. 43c). Esta disminución podría deberse a que el exceso de auxinas, es degradado o conjugado con aminoácidos para eliminar su actividad (Fig. 42C).

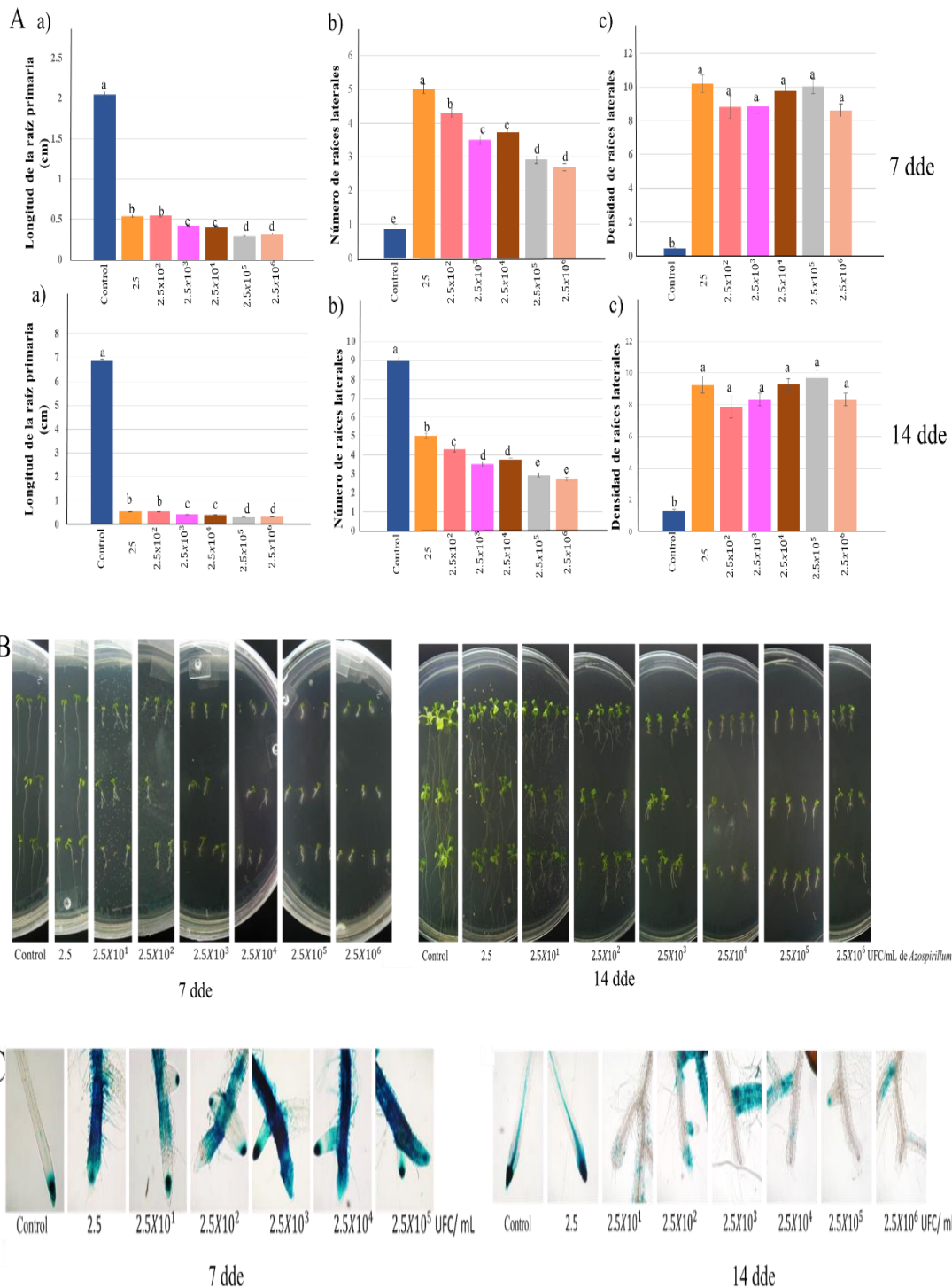


Figura 43. Efecto de la concentración de *Azospirillum* sobre la AR y el nivel de auxinas en las plántulas *DR5:uidA* de 7 y 14 dde. A. a) Longitud de la raíz primaria de plántulas expuestas durante 7 días a 25, 2.5×10^2 , 2.5×10^3 , 2.5×10^4 , 2.5×10^5 y 2.5×10^6 UFC/mL de *A. brasilense*. b) Número de raíces laterales. c) Densidad de raíces laterales. B) Fotografías representativas de las plántulas crecidas en diferentes concentraciones de *A. brasilense* observadas con un aumento de 10X. C) Fotografías representativas del nivel de auxinas en la raíz de plántulas de *Arabidopsis*. Los valores representan el promedio de 30 plántulas +/- error estándar. Las letras indican las diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros de la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Los experimentos fueron repetidos por triplicado con resultados similares.

Después se analizó el crecimiento de *A. brasilense* al interactuar con plántulas *DR5:uidA* durante siete y catorce días.

- ❖ 25 UFC/mL: las colonias de *A. brasilense* son grandes de color café intenso. Algunas de forma redonda y otras ovaladas, esta morfología se observó tanto en las colonias cercanas a la plántula como en el resto del medio.
- ❖ 2.5×10^2 UFC/mL: alrededor de la plántula, en el medio de cultivo el tamaño de la colonia disminuyó, mostraron una forma redonda y otras ovaladas de color café intenso.
- ❖ 2.5×10^3 UFC/mL: las colonias de bacteria de tamaño pequeño crecieron más cerca de las plántulas de *A. thaliana* y presentaron un color café claro y forma redonda y ovalada. En el resto del medio las colonias de bacteria son más pequeñas, redondas y blancas.
- ❖ 2.5×10^4 UFC/mL: las colonias de *A. brasilense* crecen más cerca de la plántula de *A. thaliana*, son más pequeñas que la concentración anterior, y presentan la misma morfología antes descrita cerca y lejos de las plántulas.
- ❖ 2.5×10^5 UFC/mL: colonias muy pequeñas de la bacteria crecen sobre las plántulas de *Arabidopsis*, presentaron una forma redonda de color café muy sutil, mientras que en el resto del medio las colonias son pequeñas, redondas y de color blanco.
- ❖ 2.5×10^6 UFC/mL: el tamaño de las colonias disminuyó, son redondas de color blanco y su crecimiento es sobre la plántula. En el resto del medio las colonias son más pequeñas redondas de color blanco (Fig. 44).

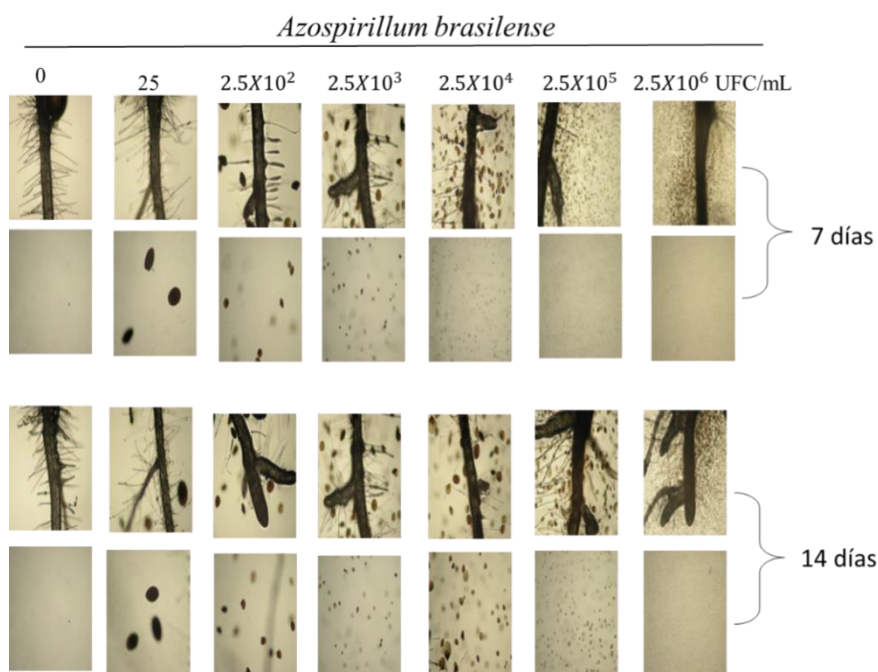


Figura 44. Crecimiento de *Azospirillum* en interacción con plántulas de *Arabidopsis* durante 7 y 14 días. Crecimiento de *Azospirillum* en interacción con plántulas observadas con un objetivo 5X.

La información de la figura 44, muestra como el crecimiento de las colonias de *A. brasilense* depende de la cantidad de inóculo; en una cantidad baja primero tienen que proliferar para asegurar su supervivencia, razón por la cual son colonias grandes que crecen sobre todo el medio. Al incrementar la cantidad de inóculo, *A. brasilense* creció cerca de la RP de las plántulas de *Arabidopsis*, debido a que la plántula les provee de una fuente de carbono. También se decidió investigar si TOR estaría participando sobre el fenotipo inducido por el AIA.

9.14 Efecto de diferentes concentraciones del AIA sobre la arquitectura radicular de plántulas *tor-es1 DR5:uidA*

Las plántulas de 5 dde fueron transferidas a medios de cultivo suplementados con 25, 50 y 100 nM de AIA, el material vegetal fue incubado durante uno, tres y seis días. En la figura 47a, se observa que todas las concentraciones de AIA ensayadas decreció la LRP, mientras que en tratamiento con AIA más estradiol, este efecto fue completamente abolido. Respecto a el NRL, este parámetro incrementó al tercer día de exposición en todas las concentraciones de AIA ensayadas de forma dosis dependiente y de manera similar al tratamiento de la hormona más el estradiol. En tanto a los seis días en todas las concentraciones de AIA no se observó ningún cambio del NRL, mientras que en los medios suplementados con AIA y en presencia de estradiol el incremento de este parámetro fue dosis dependiente (Fig. 45b). Respecto al crecimiento de las RL, se incrementó con 50 y 100 nM de AIA; mientras que en el tratamiento con estradiol, las auxinas no promueven el crecimiento de estos órganos (Fig. 45d).

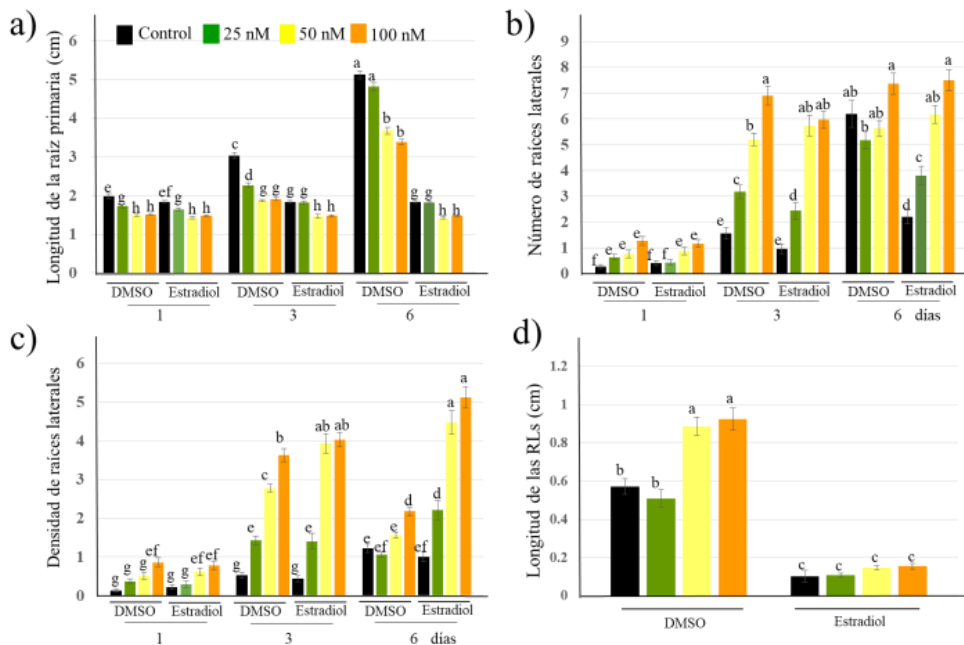


Figura 45. Efecto de diferentes concentraciones de AIA sobre los parámetros de la arquitectura radicular de plántulas *tor-es1 DR5:uidA* de 11 dde. a) Longitud de la raíz primaria de plántulas de 5 dde, expuestas 1, 3 y 6 d a 12.5, 25, 50 y 100 nM de AIA. b) Número de raíces laterales. c) Densidad de raíces laterales. d) Longitud de las raíces laterales de plántulas de 11 dde. Las letras indican las diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros de la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Los experimentos fueron repetidos por triplicado con resultados similares.

A continuación se presenta la evaluación del efecto de la bacteria en plántulas de *A. thaliana* que presentan una variación endógena del AIA.

9.15 Efecto de *Azospirillum* sobre la arquitectura radicular de plántulas 35S:YUCCA4DR5:uidA y yucca6 yucca3

Para determinar el fenotipo que induce *A. brasilense* en plántulas de la línea 35S:YUCCA4DR5:uidA que sobre produce auxinas, éstas fueron transferidas a los 5 dde a medios sin y suplementados con 2.5×10^5 UFC/mL de *A. brasilense*. En la figura 46A se puede observar que a los tres días de exposición, la bacteria en las plántulas 35S:YUCCA4DR5:uidA arrestó la LRP en la misma proporción que en DR5:uidA (Fig. 46A), mientras que el NRL incrementó en 165% y 110% al tercero y sexto día (Fig. 46A). Respecto al nivel de auxinas, no se observaron cambios en el marcador de auxinas en la ZM de la RP de las plántulas expuestas a *A. brasilense* (datos no mostrados). En tanto que, las plántulas de la doble mutante yucca6 yucca3 expuestas a *A. brasilense*, mostraron una reducción en la LRP similar al control, y un incremento del NRL de 200% y 600% al tercer y sexto día, respectivamente (Fig. 46 B).

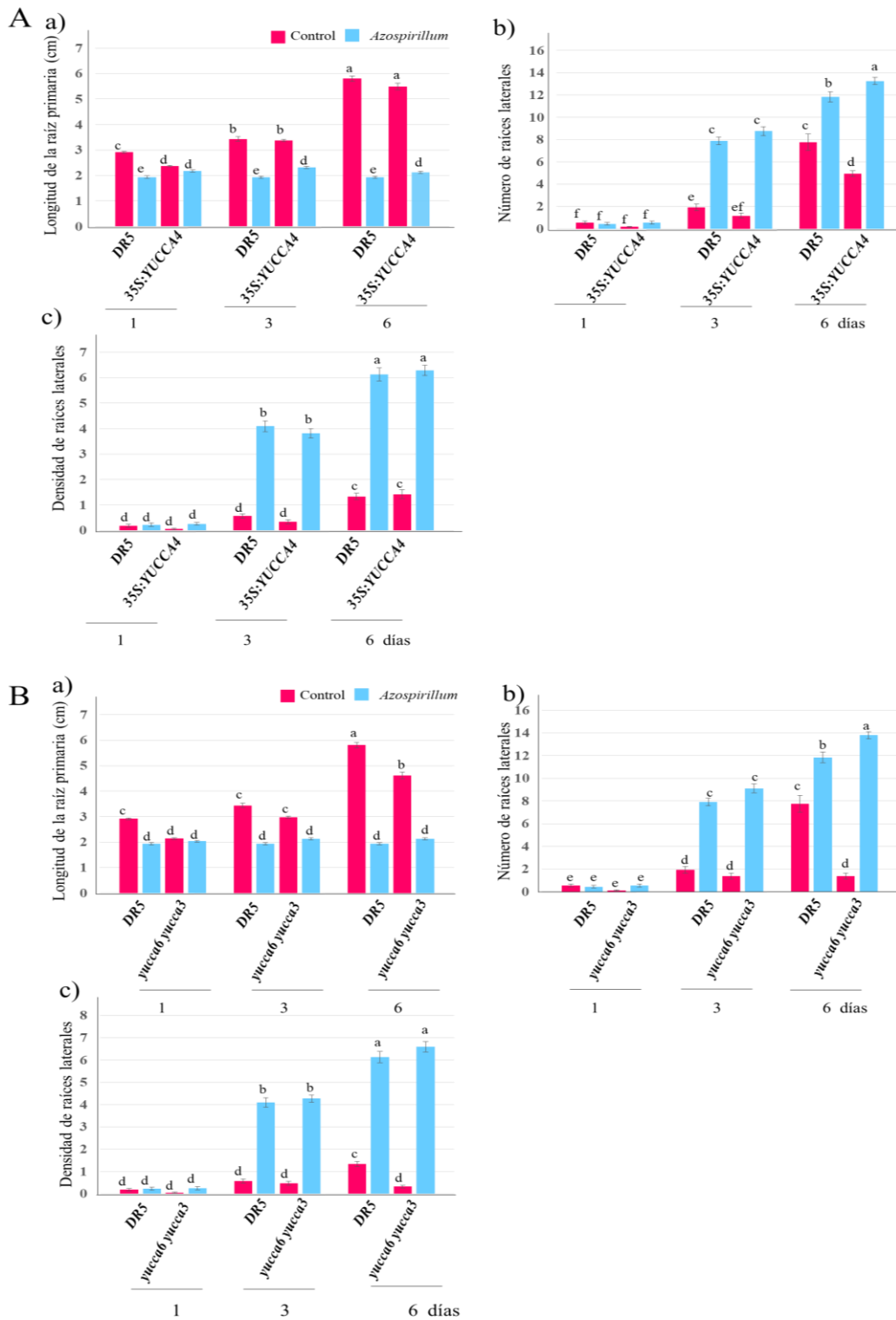


Figura 46. Efecto de *Azospirillum* sobre la arquitectura radicular de plántulas *35S:YUCCA4 DR5:uidA* y *yucca3 yucca6*. **Aa) Longitud de la raíz primaria de plántulas *35S:YUCCA4 DR5:uidA* de 5 dde, expuestas 1, 3 y 6 d a 2.5×10^5 UFC/mL de *A. brasilense*. **b)** Número de raíces laterales. **c)** Densidad de raíces laterales. **Ba)** Longitud de la raíz primaria de plántulas *yucca3 yucca6* de 5 dde, expuestas 1, 3 y 6 d a 2.5×10^5 UFC/mL de *A. brasilense*. **b)** Número de raíces laterales. **c)** Densidad de raíces laterales. Las letras indican las diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros de la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Los experimentos fueron repetidos por triplicado con resultados similares.**

En los experimentos antes descritos se esperaban fenotipos contrastantes entre las plántulas; sin embargo, ambas líneas mostraron una hipersensibilidad a las auxinas sintetizadas por *A. brasilense* en el NRL siendo dicho efecto mayor en la doble mutante *yucca3 yucca6*.

9.16 Efecto de la yucasina sobre la arquitectura radicular de plántulas *DR5:uidA* expuestas a *Azospirillum*

El AIA está involucrado en todos los procesos que regulan el desarrollo vegetal. La ruta de ácido indolpiruvico (IPA) dependiente de triptófano es la principal vía por la cual *A. thaliana* sintetiza al AIA. En esta vía, el triptófano es convertido a IPA por la Trp aminotransferasa, el cual al ser oxidado por la yucca se convierte en el AIA. Yucasina es un inhibidor de las enzimas yucca, así que en el presente experimento para evaluar el efecto de yucasina sobre la AR de plántulas de *A. thaliana* expuestas a *A. brasilense*, las plántulas *DR5:uidA* de 5 dde provenientes del medio control se transfirieron a medios de cultivo sin y suplementados con 100 μ M de yucasina y 2.5×10^5 UFC/mL. El material se incubó durante uno, tres, cinco y seis días de exposición al inhibidor y a la bacteria, al finalizar estos tiempos se evaluaron los parámetros de la AR y el nivel de auxinas. Los resultados mostraron que *A. brasilense* y yucasina juntos, redujeron la LRP y aumentaron el NRL en la misma proporción que en el tratamiento solo con la bacteria (Fig. 47a, b). En la figura 47d, se puede observar que las plántulas en presencia del inhibidor son agravitropicas, mientras que las expuestas a *A. brasilense* y yucasina muestran un fenotipo similar a las expuestas a la bacteria y se rescata el gravitropismo que se pierde por la inhibición de la síntesis endógena de AIA.

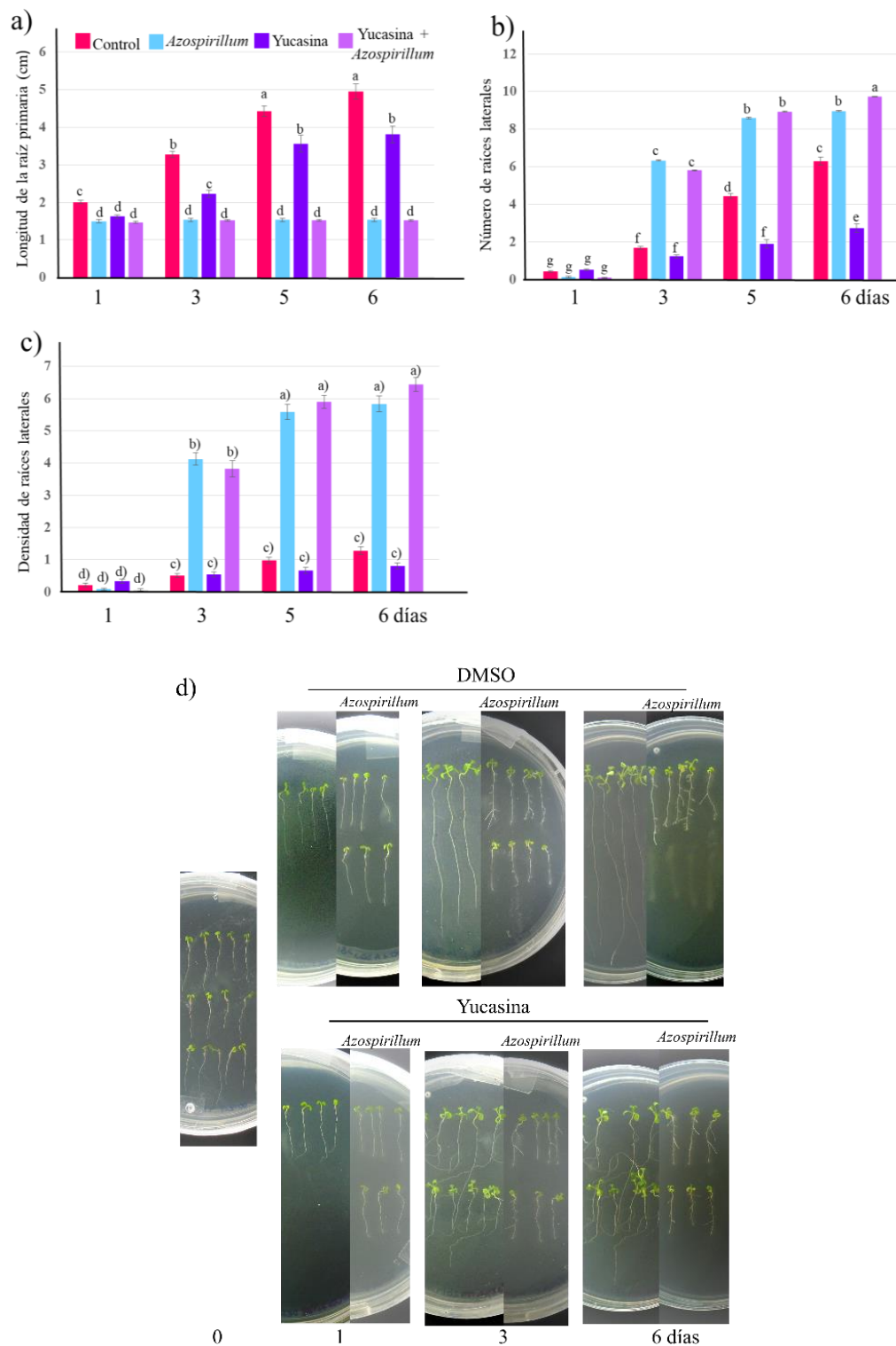


Figura 47. Efecto de la yucasina sobre la arquitectura radicular de plántulas de *Arabidopsis* expuestas a *Azospirillum*. Las semillas se sembraron y crecieron en medio control, las plántulas de 5 dde se transfirieron a medios sin y suplementados con yucasina 100 μ M y 2.5×10^5 UFC/mL de *A. brasilense*, el material se incubó durante 1, 3 y 6 d. **a)** Longitud de la raíz primaria. **b)** Numero de raíces laterales. **c)** Densidad de raíces laterales. **d)** Fotografías representativas de las plántulas expuestas durante 6 días a *Azospirillum* y a yucasina. Las letras indican las diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros de la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Los experimentos fueron repetidos por triplicado con resultados similares.

Se analizó el nivel de auxinas de plántulas *DR5:uidA* expuestas durante uno, tres y seis días a yucasina y a *A.brasilense*, la bacteria al tercer día incremento el marcador de auxinas en la ZD de la RP y al sexto día en el haz vascular de la RP. En las plántulas expuestas a 100 μ M de yucasina, el nivel de auxinas se localizó en la punta de la RP, mientras que el inhibidor junto con la bacteria, al tercer día incremento fuertemente el marcador en todo el haz vascular de la RP (Fig. 48). Este resultado se debió a que la yucasina inhibe la síntesis endógena de dicha fitohormona, sugiere que el nivel de auxinas observado en la RP de plántulas de *Arabidopsis* expuestas al inhibidor junto con *A. brasilense*, se debe a las auxinas bacterianas que fueron transportadas hacia la raíz de la planta.

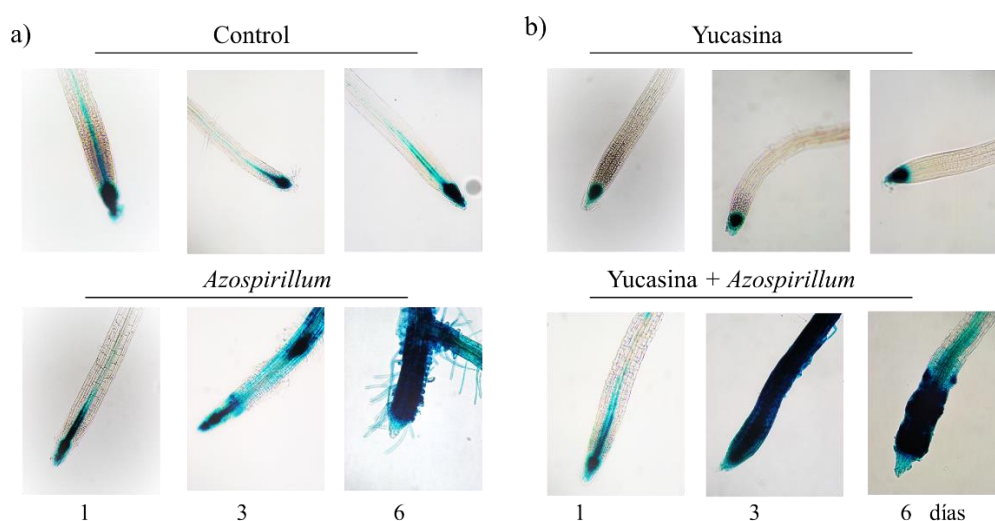


Figura 48. Efecto de la yucasina en plántulas *DR5:uidA* expuestas a *Azospirillum*. Las plántulas de 5 dde se transfirieron a medios sin y suplementados con 100 μ M de yucasina y 2.5×10^5 UFC/mL de *A. brasilense*, el nivel de auxinas se analizó al primer, tercer y sexto día de exposición a la bacteria.

9.17 Efecto de *Azospirillum* sobre el desarrollo vegetativo y reproductivo de *Arabidopsis*

Se ha reportado que *A. brasilense* detiene el crecimiento de la raíz primaria e incrementa el NRL en plantas de trigo, maíz, entre otras y que dicho fenotipo permite a las plantas mejorar la captación de agua y nutrientes para aumentar el rendimiento del grano (Hungria *et al.*, 2010). Sin embargo, se desconoce cuál es el efecto de la bacteria en plantas dicotiledóneas, por lo que en el presente trabajo se analizó el crecimiento vegetativo y reproductivo de *Arabidopsis thaliana* que estuvieron en interacción con 2.5×10^5 UFC/mL de *A. brasilense* durante 6 días.

Las plántulas de once dde fueron transferidas a suelo previamente esterilizado y se incubaron en una cámara de crecimiento bajo las mismas condiciones de luz y temperatura antes mencionadas. Cada siete días después de la transferencia, se evaluó el diámetro y el número de hojas de roseta, la longitud del tallo y el número de silicuas. En la figura 49, se puede observar que el diámetro y el número de hojas de roseta y la longitud del tallo no mostraron cambios en ambos tratamientos. Sin embargo, en las plántulas que

crecieron en presencia de *A. brasilense*, se observó un incremento de 118 % en el rendimiento de semillas en plantas de 60 dde respecto al control (Fig. 49e).

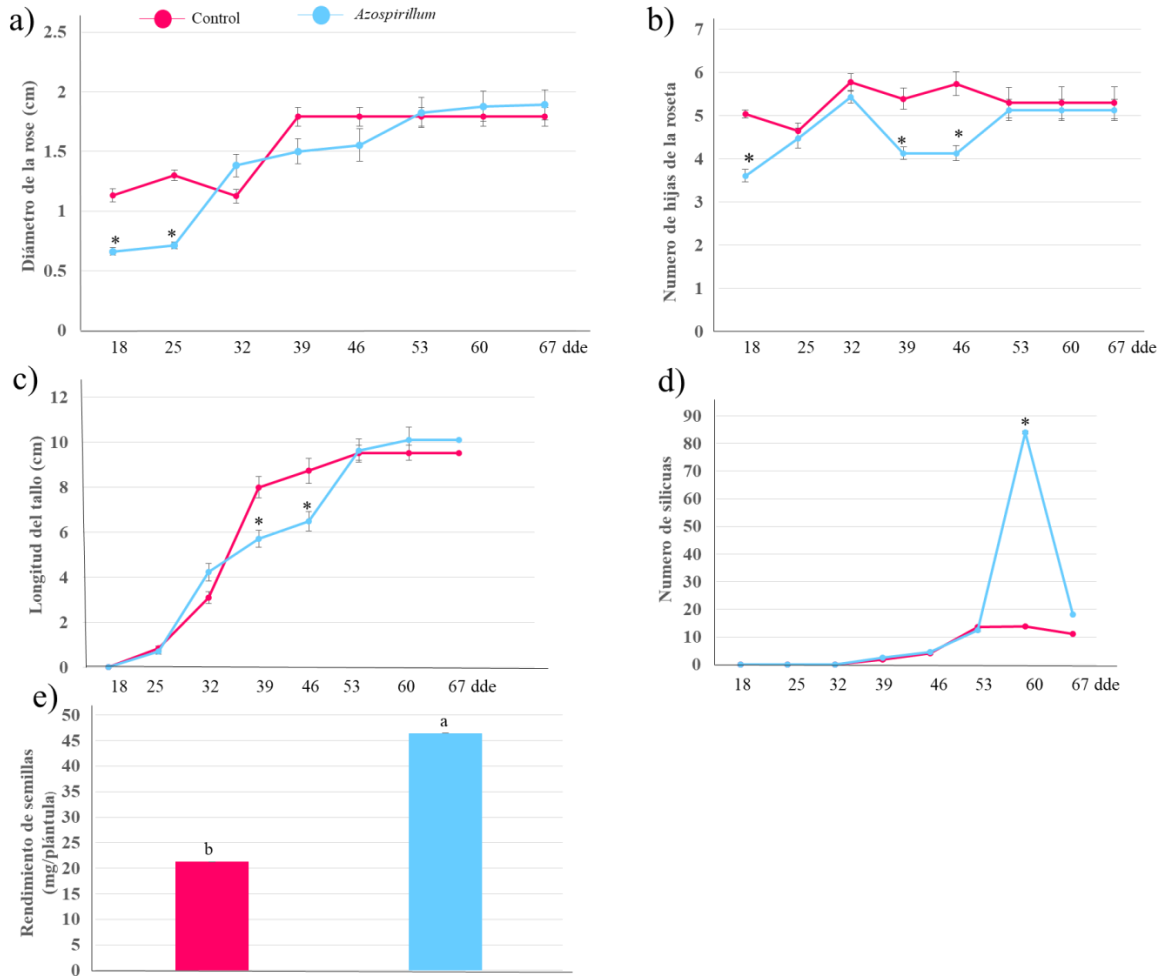


Figura 49. Cinética de crecimiento en suelo de plantas de *Arabidopsis*, después de la interacción con *Azospirillum brasilense*. Las plántulas de 11 dde de *Arabidopsis* que fueron expuestas a *A. brasilense* durante 6 días se transfirieron a suelo estéril, donde se evaluaron diferentes parámetros de crecimiento cada siete días durante ocho semanas. **a)** Diámetro de la roseta. **b)** Número de hojas de roseta. **c)** Longitud del tallo. **d)** Número de silicuas. **e)** Rendimiento de semillas. Los asteriscos indican diferencias significativas de las medias comparadas con el control ($p < 0.05$).

10. DISCUSIÓN

Las raíces son los órganos de absorción de agua y nutrientes que contribuyen en el establecimiento de poblaciones microbiana al producir exudados como fitorreguladores, ácidos orgánicos y sacarosa (Hodge *et al.*, 2009). Se estima que un 80% de los microorganismos tanto hongos como bacterias producen AIA, el cual estimula el crecimiento vegetal al modificar los niveles endógenos del AIA en plantas (Spaepen *et al.*, 2009; Khamna *et al.*, 2010). *Azospirillum brasilense* Sp245 pertenece al grupo de las PGPR que viven en el suelo y sobre las raíces de las plantas y el mecanismo propuesto por el cual esta rizobacteria promueve el crecimiento vegetal involucra principalmente a las auxinas que produce.

Las auxinas bacterianas inducen una disminución de la longitud de la raíz primaria e incrementan el número de raíces laterales y pelos radiculares (Lugtenberg y Kamilova, 2009; Spaepen *et al.*, 2009; Spaepen *et al.*, 2014). *A. brasilense* ha sido aislado de la rizosfera de cultivos de importancia económica tales como el maíz, el arroz y el trigo, desde climas tropicales hasta templados (Patriquin *et al.*, 1983) y es una de las PGPR más estudiadas por la importancia económica de dichos cultivos a nivel mundial (Hungria *et al.*, 2010).

La aplicación de las PGPR como bioinoculantes o biofertilizantes constituye una herramienta biotecnológica importante para alcanzar un mayor rendimiento en los cultivos y así aminorar el impacto negativo de la aplicación excesiva de pesticidas o fertilizantes al ambiente (Liu *et al.*, 2014).

TOR es una proteína altamente conservada en todos los eucariontes, desde organismos unicelulares a multicelulares. La cinasa TOR controla positivamente procesos anabólicos biológicos cruciales, como el ciclo celular, la biogénesis de ribosomas, la síntesis de proteínas, la transcripción, el transporte de nutrientes, la utilización de C y N, los cambios en la pared celular, la formación de cloroplastos, la fotosíntesis y negativamente la autofagia (Dobrenel *et al.*, 2016; Schepetilnikov y Ryobova, 2018; Shi *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2019; Caldana *et al.*, 2019).

Deng y colaboradores 2016, reportaron que el nivel de auxinas en la ZM de la RP de *A. thaliana* depende de TOR. Por otro lado, Xiong y colaboradores 2013, observaron que la inhibición o la desaparición del transcrito de TOR en plántulas de *A. thaliana* bloquea la reactivación del meristemo, esencial para mantener las zonas de la RP.

Debido a que *Azospirillum* detiene el crecimiento de la RP e incrementa el NRL en plántulas de *Arabidopsis*, en el presente estudio se investigó si el fenotipo antes mencionado depende de TOR. El primer ensayo consistió en evaluar el efecto de los inhibidores de TOR: Torin1 y AZD-8055 sobre de la AR de *Arabidopsis*. AZD-8055 mostró un efecto más fuerte sobre el desarrollo del sistema radicular respecto a las plántulas expuestas a Torin1 (Fig. 32); estos resultados correlacionan con lo reportado por Dong y colaboradores, 2016, donde el AZD-8055 mostró mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de plántulas de *Arabidopsis*.

Durante la interacción *Arabidopsis-Azospirillum* se observó que los inhibidores AZD-8055 y Torin1 más la bacteria no mostraron cambios sobre la LRP ni en el NRL, sino únicamente que el crecimiento de las RL dependía de TOR (Fig. 33 y 34d). Los estudios de TOR sobre el desarrollo en plantas se retrasaron, debido a que la mutación de TOR en *A. thaliana* fue letal. Xiong y Sheen 2012, obtuvieron una mutante condicionada a estradiol *tor-es1* de *Arabidopsis*, la cual en presencia de estradiol bloquea la aparición del transcrito de TOR.

En la presente investigación, plántulas de la línea antes mencionada fueron expuestas a *A. brasilense* y los resultados mostraron que tanto el incremento del NRL, como el crecimiento de estos órganos dependen de TOR (Fig. 35 b-c). Ambas estrategias mostraron resultados diferentes: la genética mostró que TOR participa en el incremento del NRL y en el crecimiento de las RL, mientras que en la farmacológica parece que TOR está involucrada solamente en el crecimiento de las RL. Nuestros resultados correlacionan con lo reportado por Zhang y colaboradores, 2018 donde evaluaron la participación de TOR sobre la concentración de clorofila en plántulas de *A. thaliana*, utilizando AZD-8055, Torin2 y la línea mutante *raptor1b*. Las plántulas de *raptor1b*, mostraron una mayor reducción en la concentración de clorofila respecto al efecto que causaron los dos inhibidores de TOR. Estos resultados sugieren que inhibirla actividad de la proteína o bloquear la transcripción del gen en diferentes condiciones de desarrollo no necesariamente conduce al mismo fenotipo. Respecto al nivel de auxinas, en ambas estrategias se observó una disminución del nivel de auxinas, resultados que correlacionan con lo reportado por Deng y colaboradores, 2016, donde observaron que la concentración de las auxinas localizada en la ZM de la RP de *Arabidopsis* depende de TOR.

Por otro lado, ha sido ampliamente reportado que el efecto de las PGPR sobre los cambios morfológicos del sistema radicular de las plantas, depende principalmente de las auxinas. En las interacciones plantas-PGPR se ha descrito que diferentes elementos de la vía de respuestas a auxinas de la planta están involucrados, por ejemplo Contesto *et al.* (2010) al inocular el follaje de *Arabidopsis* con *Phyllobacterium brassicacearum* STM196, observaron que la bacteria incrementó la expresión de algunos genes de la biosíntesis de auxinas como: *ASA1* y *CYP7982*, además de un aumento en la longitud de las raíces laterales, y que este fenotipo dependía del transporte de influjo y de la vía de señalización de las auxinas. Otro grupo de investigadores utilizaron dos cepas de *Azospirillum brasilense*: silvestre y una mutante en la biosíntesis de AIA (FA0009); al inocular plántulas de *A. thaliana* con ambas cepas, observaron que la silvestre produjo una expresión genica mayor que la mutante. Además que los genes que incrementaron su expresión a los tres de interacción estaban relacionados con la respuesta celular a la hipoxia, a la defensa, resistencia sistémica adquirida, síntesis de la pared celular vegetal, respuesta a estímulos de etileno y transporte de lípidos. Mientras que a los siete días aumento la expresión de genes relacionados a la diferenciación celular de los pelos radiculares, organización de la pared celular y vías de transducción de señales de dos componentes. Estos autores no encontraron ningún cambio en genes que participan en la vía de respuesta a las auxinas. Respecto a esta fitohormona, únicamente determinaron una baja expresión de las UDP-glucosil transferasas (*UGT73B1*, *UGT73B2*, *UGT73B3*, *UGT73B4*, *UGT73B5*), las cuales catalizan la conjugación de flavonoides a un resto de azúcar; lo que les permitió sugerir que los productos de estos genes podrían servir para atenuar el transporte polar de auxinas para proteger a la planta del exceso de auxinas bacteriales (Spaepen *et al.*, 2014).

En contraste Mantelin y colaboradores en 2006, determinaron el efecto de *Phyllobacterium* sp. sobre el desarrollo de las RL de plántulas de *Arabidopsis* cultivadas en medio suplementado con nitrato (5-10 mM), observando que la bacteria mitiga la inhibición del desarrollo de la RL de manera dependiente de la concentración de nitrato.

Mientras que Walch-Liu *et al.* 2006, reportaron tanto un aumento en la concentración de IAA en la raíz de *Arabidopsis* como una restauración del desarrollo de las RL, 24 h después de transferir las plántulas a medio con nitrato 50 a 1 mM. Los datos antes mencionados sugieren fuertemente una vía de señalización parcialmente superpuesta que involucra al transporte polar del IAA para controlar el desarrollo de las RL por la nutrición de nitrato o por la presencia de las PGPR (Contesto *et al.*, 2010).

Entre las fitohormonas que controlan el crecimiento y desarrollo vegetal destaca el AIA, el cual también ha sido utilizado por los microorganismos como molécula de señalización (Somerset *et al.*, 2004). El AIA en la planta se moviliza de una célula a otra de forma polar, dicho transporte está controlado por varios tipos de proteínas, incluidos los transportadores de influjo e eflujo. Arreola Rivera, 2018, durante la interacción *Arabidopsis-Azospirillum* analizó la participación del PAT, concluyendo que la planta requiere activo a dicho transporte para que la bacteria incremente el NRL en plántulas de *Arabidopsis*. En el presente estudio se evaluó el efecto del inhibidor del PAT, el NPA sobre cambios en la arquitectura radicular de plántulas *tor-es1 DR5:uidA* de *A. thaliana* expuestas diferentes tiempos a *A. brasilense*. En la figura 36, se puede observar que el NPA redujo el NRL en plántulas de *Arabidopsis* expuestas a *Azospirillum*, dicho parámetro mostró un decremento mayor cuando desapareció el transcrito de TOR, además el nivel de auxinas disminuyó drásticamente en la ZD de las RL (Fig. 36f), lo que sugiere que TOR regula el PAT. Estos resultados están de acuerdo con el efecto del NPA en plántulas de *Arabidopsis* inoculadas con *Bacillus* sp LZR216, las cuales en presencia del inhibidor mostraron una disminución en la LRP y el NRL respecto al control (Wang *et al.*, 2015). Posteriormente, se analizó la participación de otros elementos que participan en el PAT como son las proteínas: PGP1, BEN2 y AXR4-1 debido a que Arreola-Rivera en 2018, demostró que durante la interacción *Arabidopsis-Azospirillum* se requiere de dichas proteínas para que la bacteria aumente el NRL. Por tal motivo, en la presente investigación se determinó la participación de TOR en plántulas *pgp1*, *axr4-1* y *ben2* de *Arabidopsis* expuestas a *A. brasilense*, mostrando que la inhibición de TOR está involucrada solamente sobre el crecimiento de las RL de estas plántulas y no en el incremento del NRL (Fig. 38Ad, 38Bd y Cd). Estos resultados permiten sugerir que TOR, participa en la regulación del PAT al reducir el NRL y el crecimiento de estas.

Las plantas mantienen la homeostasis de ROS a través de mecanismos de eliminación de ROS enzimáticos y no enzimáticos conservados en la mayoría de los eucariotas, pero también los flavonoides y antocianinas mantienen su homeostasis (Chapman *et al.*, 2019). Las raíces producen flavonoides y las plantas con mutaciones en la síntesis de flavonoides presentan un aumento en la acumulación de ROS en tejidos específicos afectando el cierre de células guarda (Watkins *et al.*, 2017), el alargamiento del tubo polínico (Muhlemann *et al.*, 2018) y el desarrollo del pelo radicular (Maloney *et al.*, 2014). Los flavonoides también han sido implicados como reguladores negativos del transporte de auxinas (Gayomba *et al.*, 2016). En las mutantes alteradas en la síntesis de flavonoides, se ha observado un transporte elevado de auxinas (Peer *et al.*, 2004) que se ha relacionado con la ramificación de las raíces (Brown *et al.*, 2001), la morfología de las hojas (Ringli *et al.*,

2008) y el gravitropismo (Lewis *et al.*, 2013). Los niveles de flavonoides también controlan la oxidación del IAA (Peer *et al.*, 2013), y los niveles elevados de auxina aumentan las ROS de las células. Los mutantes con defectos en la homeostasis de ROS revelaron que el transporte de auxina también está regulado por los niveles de ROS (Fernández-Marcos *et al.*, 2013). Estos estudios indican una interacción compleja entre flavonoides, ROS y transporte de auxina; Gayomba y Muday (2020), trataron plántulas *tt4-11* con AIA, observando un incremento del número de pelos radiculares respecto a la Wt. Mientras que la carencia de la inducción de pelos radiculares en plántulas *rhd2-6* tratadas con AIA permitió a los autores sugerir que las ROS y las auxinas están conectadas para iniciar el desarrollo del pelo radicular (Gayomba y Muday, 2020).

Por otra parte, Brown y colaboradores en 2001 mostraron que en plántulas *tt4* de *Arabidopsis* suplementadas exógenamente con flavonoides, se restauró el gravitropismo y el transporte de auxinas. En nuestros experimentos, las plántulas *tt4* expuestas a *A. brasilense* mostraron un incremento dramático en el NRL (Fig. 37), debido quizá a que al no tener inhibidores endógenos del PAT, dicho transporte estaría más activo, a diferencia de los experimentos con el NPA donde dicho parámetro disminuyó.

Las raíces laterales son órganos post-embriónicos y al igual que la RP crecen por división y elongación celular, como se mencionó anteriormente, en el presente estudio se observó que el crecimiento de las RL de plántulas de *Arabidopsis* expuestas a *A. brasilense* depende de TOR. Para determinar cuál de los dos procesos está alterado al inhibir a TOR, se crecieron las líneas reporteras *CyB1:uidA* y *Exp7:uidA* en presencia de la bacteria y AZD, y los resultados mostraron que la bacteria y el inhibidor arrestan la proliferación celular y desaparece la ZE de las RL, mismo efecto causado sobre el crecimiento de la RP (Arreola-Rivera, 2018), lo que también correlaciona con lo reportado por Barrada *et al.* (2019), donde en presencia de AZD-8055 observaron una reducción en la proliferación celular en el meristemo de la RP de *Arabidopsis*.

Ha sido ampliamente reportado que *A. brasilense* sintetiza altas concentraciones de AIA, lo que provoca una reducción en la LRP y un incremento del NRL en plántulas de *A. thaliana*, fenotipo similar al causado por concentraciones altas de AIA exógenas. Así que en este estudio se comparó el efecto sobre la AR de diferentes concentraciones de bacteria y del AIA. Los resultados mostraron que ninguna de las concentraciones de AIA exógeno ensayado causaron el mismo fenotipo que *A. brasilense* (Fig. 41 y Fig. 42). Estos resultados sugieren que en la disminución de la LRP y el aumento en el NRL inducido por la bacteria, además de las auxinas podrían estar participando otras fitohormonas, como las CK y el etileno. Arreola-Rivera, 2018 determinó que en el efecto de *A. brasilense* sobre la AR de plántulas mutantes del receptor de CK (*ahk2* y *cre1-12 ahk2-2*), del etileno (*ert1*), así como los factores de transcripción (*ein2* y *ein3*) de *Arabidopsis*, podrían estar involucrados en el desarrollo de las RL de *Arabidopsis* estimuladas por la bacteria. A diferencia de lo reportado por Spaepen *et al.* (2014), donde ellos sugieren que *A. brasilense* detiene el crecimiento de la PR e incrementa el NRL únicamente por efecto de las auxinas bacterianas.

Por otro lado, se analizó cual sería el efecto de *A. brasilense* sobre la AR de plántulas de *A. thaliana* con diferentes niveles de AIA endógeno, para lo cual se utilizaron de dos estrategias: 1) la genética y 2) la farmacológica. En la primera se ensayaron las líneas de sobre-expresión de YUCCA4 (35S: *YUCCA4 DR5:uidA*) y la doble mutante (*yucca6 yucca3*); las plántulas de ambas líneas mostraron un arresto del crecimiento de la RP y un incremento mayor del NRL, respecto a la Wt. Sin embargo, *yucca6 yucca3* mostró una hipersensibilidad mayor a las auxinas bacterianas, lo que sugiere que estas últimas están supliendo a las sauxinas endógenas. El fenotipo observado en las plántulas 35S: *YUCCA4 DR5:uidA* (igual al de la doble mutante *yucca6 yucca3*) (Fig. 37d) podría deberse a una sobre-producción de kaempferol, otro regulador negativo del PAT (Rice-Evans *et al.*, 1996; Ortiz-Castro *et al.*, 2018), demostrando que el nivel de AIA endógeno de plántulas de *Arabidopsis* no participa en el efecto causado por *A. brasilense*, sino que son las auxinas bacterianas las que modifican la AR de dichas plántulas. En tanto, en la estrategia farmacológica se aplicó yucasina, 5-(4-clorofenil)-4H-1,2,4-triazol-3-tiol, un inhibidor de la biosíntesis de AIA que tiene como blanco las enzimas YUCCA (Nishimura *et al.*, 2014). Las plántulas expuestas al inhibidor y a la bacteria mostraron un incremento en el NRL, así que dicho efecto es independiente del AIA endógeno, además en estas plántulas se observó un nivel de auxinas semejante al causado únicamente por la bacteria, lo que nos permite concluir que es el AIA bacteriano el que provoca el fenotipo antes mencionado y el incremento de las auxinas en la RP de *Arabidopsis* (Fig. 47). Este comportamiento es similar a lo reportado por Tsugafune *et al.* (2017), en plántulas de *Arabidopsis* expuestas durante 5 días a yucasina y a 10 nM de AIA, donde este último restaura el crecimiento de la RP. Otro reporte mostró que en plantas de *Arabidopsis* expuestas 5 días a yucasina y a 1 μ M de AIA, este fitoregulador también restaura el crecimiento de los pelos radiculares (Nishimura *et al.*, 2014). Con base en los resultados descritos anteriormente, se propone que en la interacción *Arabidopsis-Azospirillum*, las auxinas bacterianas están siendo transportadas hacia la raíz de la plántula de manera parcialmente regulada por TOR, y que esta hormona también activa a TOR. También en las RL, la inhibición de TOR disminuyó la proliferación y la elongación celular (Fig. 50).

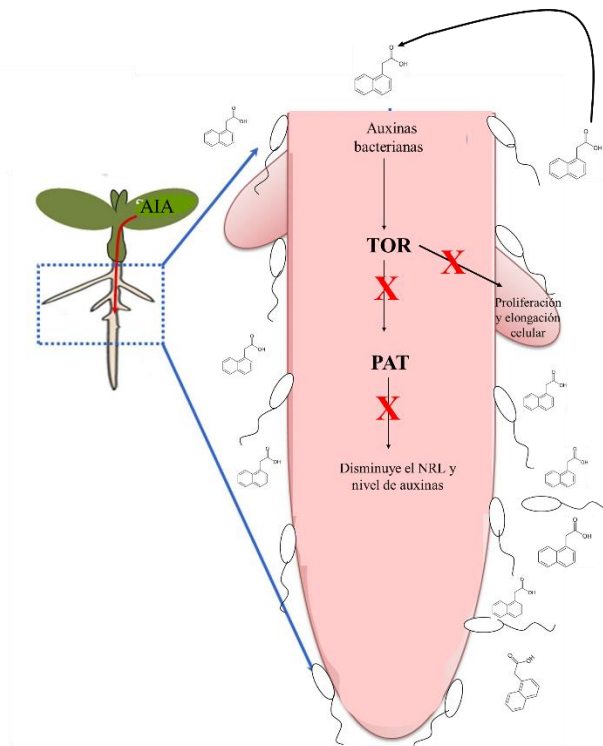


Figura 50. Modelo de la participación de TOR durante la interacción *Arabidopsis*- *Azospirillum*. El AIA bacteriano activa a TOR, dicha cinasa regula al PAT, mientras que en las RL disminuye la proliferación y elongación celular. La X representa la desaparición del transcrito de TOR.

Se ha reportado en que en la interacción *Rhizobium*-frijol, la cinasa TOR se encuentra involucrada, al observar en las raíces de plántulas *rnai tor* una disminución de los hilos de infección, y un desarrollo alterado del nódulo (Nanjareddy *et al.*, 2016), Mientras que Sun y colaboradores 2018, reportaron que TOR controla la infección del arroz por el hongo *M. oryzae*. Otro hongo que causa grandes pérdidas en los cultivos es *Fusarium graminearum*, Aznar *et al.* 2018 inocularon con este hongo, hojas de mutantes de *Arabidopsis tor*, *raptor* y *lst8* y observaron que un arresto en la expresión de TOR o de algunos de sus componentes les confiere resistencia a *Fusarium*. Mientras que resultados del presente estudio mostraron que en la interacción *Arabidopsis*-*Azospirillum*, TOR esta regulando el incremento y el crecimiento de las RL. Los datos antes mencionados permiten concluir que en la interacción benéfica o patógena de las plantas-microorganismos, TOR esta participando.

Por otro lado, se ha reportado en plantas de maíz, trigo y cebada expuestas a *A. brasilense* la bacteria incrementa el NRL, dicho fenotipo ha sido asociado a un aumento del rendimiento de las semillas de alrededor de un 3 0% (Hungria *et al.*, 2010). En esta investigación observamos que *Azospirillum brasilense* incremento el número de silicuas y en un 118% la cantidad de semillas en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Lo anterior muestra que *Azospirillum brasilense* tiene el mismo efecto sobre el rendimiento de semillas, tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas.

11. CONCLUSIONES

- TOR está involucrada tanto en el incremento y crecimiento de las RL, como en el nivel de auxinas de la RP, durante la interacción *Arabidopsis-Azospirillum*.
- TOR participa en la regulación del PAT durante la interacción *Arabidopsis-Azospirillum*.
- El efecto de la inhibición de TOR, en las mutantes *pgp1*, *axr4-1* y *ben2* solo se observó sobre el crecimiento de las RL.
- La proliferación y la elongación celular de las RL de plántulas de *Arabidopsis* expuestas a *A. brasilense* depende de TOR.
- Ninguna de las concentraciones de AIA exógenas mostraron el mismo fenotipo que causa *Azospirillum* sobre plántulas de *Arabidopsis*, así que dicho efecto puede deberse a la participación de otras fitohormonas bacteriales.
- Las plántulas *35S:YUCAA4 DR5:uidA y yucca6 yucca3* expuestas a *A. brasilense*, mostraron una hipersensibilidad sobre el NRL a las auxinas bacterianas.
- En la inhibición de la síntesis endógena del AIA en plántulas de *Arabidopsis*, se observó que *A. brasilense* induce el NRL de la misma forma que lo hace la bacteria y que existe un incremento fuerte del nivel de auxinas que depende únicamente de las auxinas bacterianas.

12. PERSPECTIVAS

- Determinar la activación de TOR en plántulas de *Arabidopsis* expuestas diferentes tiempos a *Azospirillum*
- Analizar la expresión de genes involucrados en la degradación y conjugación de auxinas en plántulas de *Arabidopsis* expuestas diferentes tiempos a *Azospirillum*.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Adibi M., Yoshida S., Weijers D. and Fleck C. 2016. Correction: Centering the organizing center in the *Arabidopsis thaliana* shoot apical meristem by combination of cytokinin signaling and self-organization. PLoS ONE 11: e014783
- Ahn C., Han J., Lee H., Lee S. and Pai H. 2011. The PP2A regulatory subunit Tap46, a component of the TOR signaling pathway, modulates growth and metabolism in plants. Plant Cell 23: 185-209.
- Ahn C.S., Lee D.H. and Pai H.S. 2019. Characterization of Maf1 in *Arabidopsis*: function under stress conditions and regulation by the TOR signaling pathway. Planta 249: 527–542.
- Aichinger A., Kornet N., Friedrich T. and Laux T. 2012. Plant stem cell niches. Annu. Rev. Plant Biol. 63: 615–636.
- Allen E.K., Allen O.N. and Newman A.S. 1953. Pseudonodulation of leguminous plants induced by 2-bromo-3,5-dichlorobenzoic acid. Am. J. Bot. 40: 429-435.
- Annapurra K., Kumar A., Kumar L.V., Govindasamy V., Bose P. and Ramadoss D. 2012. PGPR-Induced Systemic Resistance (ISR) in plant disease management. Bacteria in Agrobiolology: Disease Management. Springer Berlin, Heidelberg: 405–425.
- Arreola-Rivera J. 2018. Mecanismos moleculares de las auxinas involucrados en el desarrollo radicular durante la interacción *Arabidopsis-Azospirillum brasilense* Sp245. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Univ. Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
- Aylett C., Sauer E., Imseng S., Boehringer D., Hall M., Ban N. and Maier T. 2016. Architecture of human mTOR complex 1. Science 351: 48-52
- Aznar N., Consolo F., Salerno L. and Noel-Martínez G. 2018. TOR signaling downregulation increased resistance to the cereal killer *Fusarium graminearum*. Plant Signal. Behav. 13: e1414120.
- 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.
- Bandyopadhyay A., Blakeslee J.J., Lee O.R., Mravec J., Sauer M., Titapiwatanaku B., Makam S.N., Bouchard R., Giesler M., Martinoia E., Friml J., Peer W.A. and Murphy A.S. 2007. Interaction of PIN and PGP auxin transport mechanisms. Biochem. Soc. Trans. 35: 137-141.
- Barrada A., Djendli M., Desnos T., Mercie R., Robaglia C., Montané M. and Menand B. 2019. A TOR-YAK1 signaling axis controls cell cycle, meristem activity and plant growth in *Arabidopsis*. Development 146:dev171298.
- 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 de-Bashan L. E. 2010. Chapter two. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. *Adv. Agron.* 10: 77–136.
- Beauchamp E.M. and Platanius L.C. 2013. The evolution of the TOR pathway and its role in cancer. *Oncogene* 32: 2923-392.
- Benfey P.N. and Scheres B. 2000. Root development. *Curr. Biol.* 10: 813-815.
- Benjamins R. and Scheres B. 2008. Auxin: the looping star in plant development. *Plant Biol.* 59: 443- 465.
- Bowman J.L., Briginshaw L.N., Fisher T.J. and Flores-Sandoval. 2019. Something ancient and something neofunctionalized—evolution of land plant hormone signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 47: 67-72.
- Bradshaw A.D. 1965. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Adv. Gen.* 13: 115-155.
- Brown D.E., Rashotte A.M., Murphy A.S., Normanly J., Tague B.W., Peer A., Taiz L. and Munday G.K. 2001. Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126: 524-535.
- Brugarolas J., Lei K., Hurley R.L., Manning B.D., Reiling J.H., Hafen E., Witters L.A., Ellisen L.W. and Kaelin W.G. Jr. 2004. Regulation of mTOR functions in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Gene Dev.* 23: 2893-2904.
- Burbulis I.E., Iacobucci 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* 8: 1013–1025.
- Burdman S., Kigel J. and Okon Y. 1997. Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Soil Biol. Biochem.* 29: 923-929
- Caldana C., Martins M.C.M., Mubeen U. and Castellanos-Urrea E. 2019. The magic 'hammer' of TOR: the multiple face of a single pathway in the metabolic regulation of plant growth and development. *J. Exp. Bot.* 70: 2217-2225.
- Carles C.C. and Fletcher C.J. 2003. Shoot apical meristem maintenance: the art of a dynamic balance. *Trends Plant Sci.* 8: 394-301.
- Casimiro I., Machant A., Bhalereao R.P., Beeckman T., Dhooge S., Swarup R., Graham N., Inzé D., Sandberg G., Casero P.J. and Bennett M. 2001. Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* 13: 843-852.
- Cazzonelli C.I., Vanstraelen M., Simon S., Yin K., Carron- Arthur A., Nisan N., Tarle G., Cuttiss A.J., Searle I.R., Benkova E., Mathesius U., Masle J., Friml J. and Pogson B.J. 2013. Role of the *Arabidopsis* PIN6 auxin transporter in auxin homeostasis and auxin-mediated development. *PLoS One* 8: e70069.
- Chapman E.J. and Estelle M. 2009. Mechanism of auxin-regulates gene expression in plant. *Annu. Rev. Genet.* 43: 265-285.

- Chapman J.M., Muhlemann J.K., Gayomba S.R. and Muday G.K. 2019. RBOH-Dependent ROS synthesis and ROS scavenging by plant specialized metabolites to modulate plant development and stress response. *Chem. Res. Toxicol.* 32: 370-396.
- Chen G.H., Liu M.J., Xiong Y., Sheen J. and Wu S.H. 2018. TOR and RPS6 transmit light signals to enhance protein translation in detiolating *Arabidopsis* seedling. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* 115: 12823-12828
- Cho H.T. and Cosgrove D.J. 2002. Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 3237-3253.
- Cho M. and Cho H.T. 2013. The function of ABCB transporters in auxin transport. *Plant Signal. Behav.* 21: 1-47.
- Chow B. and McCourt P. 2006. Plant hormone receptors: perception is everything. *Genes Dev.* 20: 1998–2008.
- Chowdhury S.P., Hartmann A., Gao X. and Borriss R. 2015. Biocontrol mechanism by root-associated bacillus amyloliquefaciens FZB42-a review. *Front. Microbiol.* 6: 780
- Colón-Carmona A., You R., Haimovitch- Gal T. and Doerner P. 1999. Technical advance: spatio-temporal analysis of mitotic analysis with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J.* 20: 503-508.
- Contesto C., Milesi S., Mantelin S., Zacarini A., Desbrosses G., Varoquaux F., Bellini C., Kowalczyk M. and Tauraine B. 2010. The auxin-signaling pathway is required for lateral root response of *Arabidopsis* to the rhizobacterium *Phyllobacterium brassicacearum*. *Planta* 232: 1455-1470.
- Dal Bosco C., Douzhenko A. and Palme K. 2012. Intracellular auxin transport in pollen PIN8, PIN5 and PILS8. *Plant Signal. Behav.* 7: 1504-1505.
- Deng K., Yu L., Zheng X., Zhang K., Wang W., Dong P., Zhang J. and Ren M. 2016. Target of rapamycin is a key player for auxin signaling transduction in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 7: 291.
- Deprost D., Yao L., Sormani R., Moreau M., Leterreux G., Nicolai M., Bedu M., Robaglia C. and Meyer C. 2007. The *Arabidopsis* TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Rep.* 8: 864-870.
- Dharmasiri N., Dharmasiri S. and Estelle M. 2005. The F-box protein TIR is an auxin receptor. *Nature* 435: 441-445.
- Díaz-Zorita M. and Fernández-Canigia M.V. 2009. Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. *Eur. J. Soil Biol.* 45: 3–11.
- Ding Z., Wang B., Moreno I., Dupláková N., Simon S., Carraro N., Reemmer J., Pěňčík A., Chen X., Tejos R., Skůpa P., Pollmann S., Mravec J., Petrášek J., Zažimalová E., Honys D., Rolčík J., Murphy A., Orellana A., Geisler M. and Friml J. 2012. ER-localized auxin transporter PIN8 regulates auxin homeostasis and male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Nat. Commun.* 3: 1-9.

- Dobbelaere S., Vanderleyden J. and Okon Y. 2003. Plant Growth-Promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit. Rev. Plant Sci.* 22: 107–149.
- Dobrenel T., Caldana C., Hanson J., Robaglia C., Vincentz M., Veit B. and Meyer C. 2016. TOR signaling and nutrient sensing. *Annu. Rev. Plant Biol.* 67: 261-285.
- Dolan L., Janmaat k., Willemsen V., Linstead P. Poething S., Roberts K. and Scheres B. 1993. Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119: 71-84.
- Dong P., Xiong F., Que Y., Wang K., Yu L., Li Z. and Ren M. 2015. Expression profiling and functional analysis reveals that TOR is a key player in regulating photosynthesis and phytohormone signaling pathways in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 6: 677.
- Dong Y., Silbermann M., Speiser A., Forieri I., Linster E., Poschet G., Samami A.A., Wanatabe M., Sticht C., Teleman A.A., Deragon J.M., Saito K., Hell R. and Wirtz M. 2017. Sulfur availability regulates plant growth via glucose-TOR signaling. *Nat. Commun.* 8: 1174.
- Ehrhardt D., Wais R. and Long S. 1996. Calcium spiking in plant root hairs responding to Rhizobium nodulation signals. *Cell* 85: 673–681.
- Engelman J., Luo J. and Cantley L. 2006. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinase as regulators of growth and metabolism. *Nat. Rev. Genet.* 7: 606-619
- Fernández-Marcos M., Sanz L., Lewis D.R., Muday G.K. and Lorenzo o. 2013. Control os auxin transport by reactive oxygen and nitrogen species. In *Polar Auxin Transport* (ed. Chen R. and Baluška), pp. 103-117. Berlin, Heideberg: Springer Berlin Haidelberg.
- Fiers M., Ku K.L. and Liu, C.M. 2007. CLE peptide ligands and their roles in establishing meristems. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 39–43.
- Finet C. and Jaillais Y. 2012. Auxology: When auxin meets plant evo-devo. *Dev. Biol.* 369:19-31.
- Gao X., Zhang Y., Arrazola O., Hino O., Kobayashi T., Yeung R.S., Ru B. and Pan D. 2002. Tsc tumours suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signaling. *Nat. Cell Biol.* 4: 699-704.
- Goyomba S.R., Watkins J.M. and Muday G.K. 2016. Flovonols regulate plant growth and development through regulation of auxin transport and cell redox status. In *Recent Advances in Polyphenol Research*. pp. 143-170. John Wile & Sons. Ltd.
- Gayomba S.R. and Muday G.K. 2020. Flavonols regulate root hair development by modulating accumulation of reactive oxygen species in the root epidermis. *Development* 147: dev185819.
- Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y.D., Jürgens, G. and Palme, K. 2001. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 413: 425– 428.
- Gingras A.C., Raught B. and Sonenberg N. 1999. eIF4E Initiation factors: Effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 913-963.

- González E. and Hanson J. 2017. Shaping plant development through the SnRK1-TOR metabolic regulators. *Curr. Opin. Plant Biol.* 35: 152-157.
- Gray N.S., Wodicka L., Thunnissen A.M., Normand T.C., Know S., Espinoza F.H., Morgan D.O., Barnes G., Lecler S., Mijer L., Kim S.H., Lockhart D.J. and Schultz P.G. 1998. Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors. *Science* 281: 533-538.
- Gutiérrez-Mañero F., Ramos-Solano B., Probanza A., Mehouchi J., Tadeo F. and Talon M. 2001. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol. Plant.* 11: 206-211
- Hamedi J. and Mohammadipanah F. 2015. Biotechnological application and taxonomical distribution of plant growth promoting actinobacteria. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 42: 157-171.
- Hartmann M., Frey B., Mayer J., Mader P. and Widmer F. 2015. Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming. *The ISME J.* 9: 1177-1194.
- Hayashi K. 2012. The interaction and integration of auxin signaling components. *Plant Cell Physiol.* 53: 965-975.
- Henriques R., Bögre L., Horváth B. and Magyar Z. 2014. Balancing act: matching growth with environment by the TOR signaling pathway. *J. Exp. Bot.* 65: 2691-2701.
- Henriques R., Magyar Z. and Bogre L. 2013. S6K1 and E2FB are in mutually antagonistic regulatory links controlling cell growth and proliferation in *Arabidopsis*. *Plant Signal. Behav.* 8:24367.
- Herms D. and Mattoson W. 1994. Plant growth and defense. *Trends Ecol. Evol.* 12: 488.
- Hobbie L. and Estelle M. 1995. The *axr4* auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene important for root gravitropism and lateral root initiation. *Plant J.* 7:211-220.
- Hodge A., Barta G., Doussan C., Merchan F. and Crespi M. 2009. Plant root growth, architecture and function. *Plant Soil* 321: 153-187.
- Hong K., Choi W., Hwang S., Kim S., Kim H., Choi S., Kim J. and Hwang K. 2008. Function of novel GDSL-type pepper lipase gene, CaGKIP1, in disease susceptibility and abiotic stress tolerance. *Planta* 227: 539-558.
- Hungria M., Campo R.J., Souza E.M. and Pedrosa F. O. 2010. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil* 331:413-425
- Huot B., Yao J., Montgomery B. and He S. 2014. Growth-defense tradeoffs in plant: A balancing act to optimize fitness. *Mol. Plant* 7: 1267-1287.
- Inoki K., Li Y., Xu T. and Guan K.L. 2003. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev.* 17:1829-1834.

- Jason S.L.Y. and Wei C. 2016. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development* 14: 3050-3060.
- Jastrzebski K, Hannan K.M., House C.M., Hung S.S.C., Pearson R.B. and Hannan R.D. 2011. A phospho-proteomic screen identifies novel S6K1 and mTORC1 substrates revealing additional complexity in the signaling network regulating cell growth. *Cell. Signal.* 23: 1338–1347.
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A. and Bevan M.W. 1987. GUS fusión: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusión marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907.
- Jeong S., Trotochaud A.E. and Clark, S.E. 1999. The *Arabidopsis* CLAVATA2 gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the CLAVATA1 receptor-like kinase. *Plant Cell* 11: 1925–1933.
- Jossier M., Bouly J., Meimoun P., Arjmand A, Lessard P., Hawley S., Grahame D. and Thomas M. 2009. SnRK1 (SNF1-related kinase 1) has a central role in sugar and ABA signalling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 59: 316–328.
- Kang J., Park H., Burla B., Kretschmar T., Lee Y. and Martinoia E. 2011. Plant ABC transporters. *Plant Cell Rep.* 29: 643-650.
- Kant S., Bi Y.M., Zhu T. and Rothstein S.J. 2009. *SAUR39*, a small auxin-up RNA gene, acts as a negative regulator of auxin synthesis and transport in rice. *Plant Physiol.* 151: 691-701.
- Kazan K. and Manners J.M. 2009. Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* 14: 373-382.
- Khamna S., Yokota A., Peberdy F.J. and Lumyong S. 2010. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medical plant rhizosphere soils. *Eurasia J. Biosci.* 4: 23-32.
- Kieber J. and Schaller G.E. 2018. Cytokinin signaling in plant development. *Development* 145: dev149344
- Kim J., Harter K. and Theologis A. 1997. Protein–protein interactions among the Aux/IAA proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 11786–11791.
- Kircher S. and Schopfer P. 2016. Priming and positioning of lateral roots in *Arabidopsis*. An approach for an integrating concept. *J. Exp. Bot.* 67:1411-1420.
- Korasick D.A., Ander T.A. and Strader L.C. 2013. Auxin biosynthesis and storage forms. *J. Exp. Bot.* 64: 2541-2555.
- Lambrecht M., Okon Y., Vande Broek A. and Vanderleyden J. 2000. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends Microbiol.* 8: 298–300.
- Laskowski M. and ten Tusscher K.H. 2017. Periodic lateral root priming: what make it tick?. *Plant Cell* 29: 432-444.

- Lavenus J., Goh T., Roberts I, Guyomarch S., Lucas M., De Smet I., Fukaki H., Beeckman T., Bennett M. and Laplaze L. 2013. Lateral root development in *Arabidopsis*: fifty shades of auxin. *Trends Plant Sci.* 18: 450-458.
- Lee Y., Munnik T. and Lee Y. 2010. Plant phosphatidylinositol 3-kinase. In *lipids signaling in plants*, ed Munnik T (Plant Cell Monographs. Springer Verlag, Berlin Heidelberg), pp 95-106.
- Lee Z.H., Hirakawa T., Yamaguchi N and Ito T. 2019. The roles of plant hormones and their interaction with regulatory genes in determining meristem activity. *Int. J. Mol. Sci.* 20: pii E4065.
- Leiber R.M., John F., Verthertbruggen Y., Diet A., Knox J.P., and Ringli C. 2010. The TOR pathway modulates the structure of cell walls in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 22:1898-1908.
- Lenhard M., Jürgens G. and Laux T. 2002. The *WUCHEL* and *SHOOTMERISTEMLESS* genes fulfill complementary roles in *Arabidopsis* shoot meristem regulation. *Development* 129: 3195-3206.
- Lewis D.R., Olex A.L., Lundy S.R., Turkett W.H., Fetrow J.S. and Muday G.K. 2013 A kinetic os the auxin transcriptome reveals cell wall remodeling proteins that modulated lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25: 3329-3346.
- Li X., Cai W., Liu Y., Fu L., Fu L., Liu H., Xu T. and Xiong Y. 2016. Differential TOR activation and cell proliferation in *Arabidopsis* root and shoot apices. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 10: 2765-2770.
- Liu W., Hou J., Wang Q., Ding L. and Luo Y. 2014. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria and their effects on phytoremediation of petroleum-contaminated saline-alkali soil. *Chemosphere* 117: 3003-3008.
- Liu Y. and Basham D. 2010. TOR is a negative regulator of autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*5: e11883.
- López-Bucio J., Cruz- Ramírez A. and Herrera-Estrella L. 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. Plants Biol.* 6: 280-287.
- Lotkowska M.E., Tohge T., Fernie A.R., Xue G.P., Balazadeh S. and Mueller-Roeber B. 2015. The *Arabidopsis* transcription factor MYB112 promotes anthocyanin formation during salinity and underhigh light stress. *Plant Physiol.* 169: 1862–1880.
- Lugtenberg B. and Kamilova F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 541-556.
- Ma Q. and Robert S. 2013. Auxin biology revealed by small molecules. *Physiol. Plant.* 151: 25-42.
- Mahfouz M., Kim S., Delauney A. and Verma D. 2006. *Arabidopsis* TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *Plant Cell*18: 477-490.

- Malamy J.E. and Benfey P.N. 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124: 33-36.
- Maloney G.S., DiNapoli K.T. and Muday G.K. 2014. The anthocyanin reduced tomato mutant demonstrates the role of flavonols in tomato lateral root and root hair development. *Plant Physiol.* 166: 614-631.
- Mandel J. R., Dikow R.B., Funk V.A., Masalia R.R., Staton E., Kozik A., Michelmore R.W., Rieseberg L.H. and Burk J.M. 2014. A target enrichment method for gathering phylogenetic information from hundreds of loci: An example from the compositae. *Appl. Plant Sci.* 2: apps. 1300085.
- Mantelin S., Desbrosses G., Larcher M., Tranbarger T.J., Cleyet-Marel J.C. and Touraine B. 2006. Nitrate-dependent control of root architecture and N nutrition are altered by a plant growth promoting *Phyllobacterium* sp. *Planta* 223: 591-603.
- Martinoia E., Grill E., Tommssini R., Kreuz K. and Amrhein N. 1993. ATP dependent glutathione S-conjugate export pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* 364: 247: 249.
- Meinke D.W., Cherry J.M., Dean C., Rounsley S.D. and Koornneef M. 1998. *Arabidopsisthaliana*: A model plant for genome analysis. *Science* 282: 679-682
- Menand B., Desnos T., Nussaume L., Berger F., Bouchez D., Meyer C. and Robaglia C. 2002. Expression and disruption of the *Arabidopsis TOR (Target Of Rapamycin)* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* 99: 6422-6427.
- Michniewicz M., Zago M.K., Abas L., Weijers D., Schweighofer A., Meskiene I., Heisler M.G., Ohno C., Zhang J., Huang F., Schwab R., Weigel D., Meyerowitz E.M., Luschnig C., Offringa R. and Friml J. 2007. Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux. *Cell* 130: 1044-1056.
- Montane M. and Menand B. 2013. ATP-competitive mTOR kinase inhibitors delay plant growth by triggering early differentiation of meristematic cells but not developmental patterning change. *J. Exp. Bot.*64: 4361-4374.
- Montane M. and Menand B. 2019. TOR inhibitors: from mammalian outcomes to pharmacogenetics in plants and algae. *J. Exp. Bot.* 70: 2297-2312.
- Montiel G., Pascal G., Allemand C.J. and Breton C. 2004. Transcription factor networks. Pathways to the knowledge of root development. *Plant Physiol.* 136: 3478-3485.
- Motte H., Vanneste S. and Beeckman T. 2019. Molecular and environmental regulation of root development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 70: 465-488
- Moubayidin L., Di Mambro R. and Sabatini S. 2009. Cytokinin-auxin crosstalk. *Trends Plant Sci.* 14: 557-562.
- Muhlemann J.K., Younts T.L. and Muday G.K. 2018. Flavonols control pollen tube growth and integrity by regulating ROS homeostasis during high-temperature stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115: E11188-E11197.
- Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*15: 473-497.

- Nanjareddy K., Blanco L., Arthikala K., Affantranger X., Quinto C., Sánchez F. and Lara M. 2016. A legume TOR protein kinase regulates *Rhizobium* symbiosis and is essential for infection and nodule. *Plant Physiol.* 172:2002-2020.
- Nishimura T., Hayashi K., Suzuki H., Gyohda A., Takaoka C., Sakaguchi Y., Matsumoto S., Kasahara T., Kato J., Kamiya Y. and Koshiba T. 2013. Yucasin is a potent inhibitor of YUCCA, a key enzyme in auxin biosynthesis. *Plant J.* 77: 352-366.
- Ohyama K., Shinohara H., Ogawa-Ohnishi M. and Matsubayashi Y. 2009. A glycopeptide regulating stem cell fate in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Chem. Biol.* 5: 878–880.
- Oldroyd G. and Downie J. 2008. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 519–546.
- Olivares-Reyes J.A. and Arellano-Plancarte A. 2008. Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Rev. Edu. Bioq.* 27: 9-18.
- Oluwaseyi S., Bernad R. and Olubukola O. 2017. Mechanims of action of plant growth promoting bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33: 181-197.
- Ortiz-Castro R., Monribot-Villanueva J.L., Guerrero-Analco J.A., Munguía-Rodríguez A.G. and López-Bucio J. 2018. Untargeted and targeted metabolomics analysis reveals a posible role of flavin monooxygenase YUCCA4 on the production of glucosinolates and plant development in *Arabidopsis*. XXXII Congreso Nacional de Bioquímica.
- Otterhag L. 2006. *Arabidopsis* PDK1: identification of sites important for activity and downstream phosphorylation of S6 kinase. *Biochimie* 88:11-21.
- Padje A.V., Whiteside M.D. and Kiers E.T. 2016. Signals and cues in the evolution of plant-microbe communication. *Curr. Opin. Plant Biol.* 32: 47-52.
- Palmer C.M., Bush S.M. and Maloof J.N. 2012. Phenotypic and developmental plasticity in plants. In: eLS. John Wiley and Sons, Ltd:Chichester
- Patriquin D.G., Döbereiner J. and Jain D.K. 1983. Sites and processes of association between diazotrophs and crresses. *Can. J. Microbiol.* 29: 900-915.
- Peer W.A., Bandyopadhyay A., Blakeslee J.J., Makam S.N., Chen R.J., Masson P.H. and Murphy A.S. 2004. Variation in expression and protein localization of the PIN family of auxin efflux facilitator proteins in flavonoid mutants with altered auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16: 1898–1911.
- Peer W.A., Chen Y. and Murphy A.S. 2013. Evidence of oxidative attenuation of auxin signalling. *J. Exp. Bot.* 64: 2629-2639.
- Peret B., Larrieu A. and Bennet M.J. 2009. Lateral root emergence: a difficult birth. *Trends Plant Sci.* 60: 3637-3643.
- Perilli S., Di Mambro R. and Sabatini S. 2012. Growth and development of the root apical meristem. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15:17–23.
- Pfeiffer A., Janocha D., Dong Y., Medzihradsky A., Schone S., Daum G., Suzaki T., Forner J., Langebecker T., Rempel E., Schmid M., Wirtz M., Hell R. and Lohmann J.

2016. Integration of light and metabolic signals for stem cell activation at the shoot apical meristem. *eLife* 5: e17023.
- Pollastri S. and Tattini M. 2011. Flavonols, old compounds for old roles. *Ann. Bot.* 108: 1225–1233.
- Rangel de Souza A.L.S., Rangel de Souza S.A., De Olivera M.V.V., Terraz T.M., Figueiredo F.A., Ferraz T.M., Da Silva N.D., Rangel P.L., Panisset C.R.S., Olivares F.L., Campostrini E. and Fiho de Souza G.A. 2015. Endophytic colonization of *Arabidopsis thaliana* by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and its effect on plant growth promotion, plant physiology, and activation of plant defense. *Plant Soil* 399: 257–270.
- Rashotte A.M., Brady S.R., Reed R.C., Ante S.J. and Muday G.K. 2000. Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 22: 481-490.
- Ren H. and Gray W.M. 2015. SAUR proteins as effectors of hormonal and environmental signals in plant growth. *Mol. Plant.* 8: 1153-1164.
- Rexin D., Meyer C., Robaglia C., and Veit B. 2015. TOR signalling in plants. *Biochem. J.* 470: 1-14.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J. and Pagana G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20: 933-956.
- Ringli C., Bigler L., Kuhn B.M., Lieber R.M., Diet A., Santelia D., Frey B., Pollmann S. and Klein M. 2008. The modified flavonol glycosylation profile in the *Arabidopsis roll* mutants results in alteration in plant growth and cell shape formation. *Plant Cell* 20: 1470-1471.
- Robert H.S. and Friml J. 2009. Auxin and other signals on the move in plant. *Nat. Chem. Biol.* 5: 325-332.
- Rodriguez M., Parola R., Andreola S., Pereyra C. and Martínez-Noël G. 2019. TOR and SnRK1 signaling pathways in plant response to abiotic stresses: Do they always act according to the “yin-yang” model?. *Plant Sci.* 288: 110220.
- Rodriguez M., Parola R., Andreola S., Pereyra C. and Martínez-Noël G. 2019. TOR and SnRK1 signaling pathways in plant response to abiotic stresses: Do they always act according to the “yin-yang” model?. *Plant Sci.* 288: 110220.
- Russell R.C., Fang C. and Guan K.L. 2011. An emerging role for TOR signaling in mammalian tissue and stem cell physiology. *Development* 138: 3343-3356.
- Ryabova L.A., Robaglia C. and Meyer C. 2019. Target of Rapamycin kinase: central regulatory hub for plant growth and metabolism. *J. Exp. Bot.* 70: 2211-2216.
- Sang Y., Cui D. and Wang D. 2001. Phospholipase D and phosphatidic acid-mediated generation of superoxide in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126: 1449–1458.
- Santelia D., Henrichs S., Vincenzetti V., Sauer M., Bigler L., Klein M., Bailly A., Lee Y., Friml J., Geisler M. and Martinoia E. 2008. Flavonoids redirect PIN-mediated polar auxin fluxes during root gravitropic responses. *J. Biol. Chem.* 283: 31218– 31226.
- Santner A. and Estelle M. 2009. Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature* 459: 1071-1078.

- Santoyo G., Moreno-Hagelsieb G., del Carmen Orozco-Mosqueda M. and Glick B.R. 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol. Res.* 183: 92–99.
- Sauer M., Robert S. and Kleine-Vehn J. 2013. Auxin: simply complicated. *J. Exp. Bot.* 64:2565- 2577.
- 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.
- Schaufelberger M., Galbier F., Herger A., de Brito Francisco R., Roffler S., Clement G., Diet A., Hörtensteiner S., Wicker T. and Ringli C. 2019. Mutations in the *Arabidopsis* ROL17/isopropylmalate synthase 1 locus alter amino acid content, modify the TOR network, and suppress the root hair cell development mutant *lrx1*. *J. Exp. Bot.* 70: 2313–2323.
- Schepetilnikov M. and Ryabova L.A. 2018. Recent discoveries on the role of TOR (Target of rapamycin) signaling in translation in plants. *Plant Physiol.* 176: 1095-1105.
- Schepetilnikov M., Dimitrova M., Mancera-Martinez E., Geldreich A., Keller M. and Ryabova L.A. 2013. TOR and S6K1 promote translation reinitiation of uORF-containing mRNAs via phosphorylation of eIF3h. *EMBO J.* 32: 1087–1102.
- Schoof H., Lenhard M., Haecker A., Mayer K.F. Gürgens G. and Laux T. 2000. The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristem is maintained by regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSHEL* gene. *Cell* 100: 635-644.
- Schwartz T., Armant O., Bretschneider N., Hahn A., Kirchen S., Seifert M. and Dötsch A. 2015. Whole genome and transcriptome analyses of environmental antibiotic sensitive and multi-resistant *Pseudomonas aureginosa* isolates exposed to waste water and tap water. *Microb. Biotechnol.* 8: 116-130.
- Shi L., Wu Y. and Sheen J. 2018. TOR signaling in plants: conservation and innovation. *Development* 145:1-13.
- Somers E., Vanderleyden J. and Srinivasan M. 2004. Rhizosphere bacterial signaling: a love parade beneath our feet. *Crit. Rev. Microbiol.* 30: 205-240.
- Sormani R., Yao L., Menand B., Ennar N., Lecampion C., Meyer C. and Robaglia C. 2007. *Saccharomyces cerevisiae* FKBP12 binds *Arabidopsis thaliana* TOR and its expression in plants leads to rapamycin susceptibility. *BMC Plant Biol.* 7:26.
- Soto J. and Bassham D. 2017. SnRK1 activates autophagy via the TOR signaling pathway. *PLoS One* 12: e0182591.
- 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 growth-promoting actions of rhizobacteria. *Plant Soil* 51: 283-230.
- Spallek T., Gan P., Kodata Y. and Shirasu K. 2018. Same tune, different song-cytokinins as virulence factors in plant-pathogen interaction?. *Curr. Opin. Plant Sci.* 44: 82-87.

- Stahl Y. and Simon R. 2005. Plant cell niches. *Int. J. Dev. Biol.* 49: 479-489.
- Strader R.C. and Zhao Y. 2016. Auxin perception and downstream events. *Curr. Opin. Biol.* 33: 8-14.
- Sun G., Elowsky C., Li G. and Wilson R. 2018. TOR-autophagy branch signaling via *Impl* dictates plant-microbe biotrophic interface longevity. *PLoS Genet.* 14: e1007814.
- 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.
- Tsugafune S., Mashiguchi K., Fukui K., Takebayashi Y., Nishimura T., Sakai T., Shimada Y., Kasahara H., Koshiba T. and Hayashi K. 2017. Yucasin DF, a potent and persistent inhibitor of auxin biosynthesis in plants. *Sci. Rep.* 7: 13992.
- Turck F., Zilbermann F., Kozma S., Thomas G. and Nagy F. 2004. Phytohormones participate in an S6 kinase signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134: 1527–1535.
- Ulmasov T., Murfett J., Hagen G. and Guilfoyle T.J. 1997. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes contain natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9: 1963- 1971.
- Vacheron J., Desbrosses G., Lara-Bouffaud M., Taurine B., Moenne-Loccoz Y., Muller D., Legendre L., Wisniewski F. and Prigent-Combaret P. 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front. Plant Sci.* 4:1-19.
- van Dam T.J.P., Zwartkuis F.J.T., Bos J.L. and Snel B. 2011. Evolution of the TOR pathway. *J. Mol. Evol.* 73: 209-220.
- van den Berg C., Willemsen V., Hendriks G., Weisbeek P. and Scheres B. 1997. Short-range control of cell differentiation in *Arabidopsis* root meristem. *Nature* 390: 287-289.
- Vanneste S. and Friml J. 2009. Auxin: A trigger for change in plant development. *Plant Cell* 136: 1005-1016.
- Verbon E.H. and Liberman M. 2016. Beneficial microbes affect endogenous mechanisms controlling root development. *Trends Plant Sci.* 21: 218-229.
- Veresoglou S.D. and Menexes G. 2010. Impact of inoculation with *Azospirillum* spp. On growth properties and seed yield of wheat: a meta-analysis of studies in the ISI Web of Science from 1981 a 2008. *Plant Soil* 337: 469-480.
- Vezina C., Kudelski A. and Sehgal S.N. 1975. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic.I. Taxonomy of the producing streptomyces and isolation of the active principles. *J. Antibiot.* 28:721-726.
- Vieten A., Vanneste S., Wisniewska J., Benková E., Benjamins R., Beeckman T., Luschning C. and Friml J. 2005. Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* 132: 4521-4531.

- Vlesschauwer D., Filipe O., Hoffman G., Seifi S., Haeck A., Canlas P., Bockhaven J., De Waele E., Demeestere K., Roland P. and Hofte M. 2017. Target of rapamycin signaling orchestrates growth-defense trade-off in plant. *New Phytol.* 2018:305-319.
- Walch-Liu P., Ivanov I.I., Filleur S., Gana Y., Remans T. and Forde B.G. 2006. Nitrogen regulation of root braching. *Ann. Bot.* 97: 875-881.
- Wang J., Zhang Y., Li Y., Wang X., Nan W., Hu Y., Zhang H., Zhao C., Wang F., Li P., Shi H. and Bi Y. 2015. Endophytic microbes *Bacillus* sp. LZR216-regulated root development is dependent on polar auxin transport in *Arabidopsis* seedling. *Plant Cell Rep.* 34: 1075-1087.
- Wang P., Zhao Y., Li Z., Hsu C., Liu X., Fu L., Hou Y., Du Y., Xie S., Zhang C., Gao J., Cao M., Huang X., Zhu Y., Tang K., Wang X., Tao W.A., Xiong Y. and Zhu J. 2018. Reciprocal regulation of the TOR kinase and ABA receptor balances plant growth and stress response. *Mol Cell* 69: 100-112.
- Wang W., Qiu Z., Tan H. and Cao L. 2014. Siderophore production by actinobacteria. *Biometals* 27: 623-631.
- Wang X. 2002. Phospholipase D in hormonal and stress signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 408-414.
- Wang Y. and Li X. 2008. Salt stress-induces cell reprogramming, cell fate switch and adaptive plasticity during root hair development in *Arabidopsis*. *Plant Signal. Behav.* 3: 466-438.
- Wang Y.H. and Irving H.R. 2011. Developing a model of plant hormone interactions. *Plant Signal. Behav.* 6: 495-500.
- Watanabe S., Sato M., Sawada Y., Tanaka M., Matsui A., Kanno Y., Hirai M.Y., Seki M., Sakomoto A. and Seo M. 2018. *Arabidopsis molybdenum cofactor sulfurase ABA3* contributes to anthocyanin accumulation and oxidative stress tolerance in ABA-dependent and independent ways. *Sci. Rep.* 8: 16592.
- Watkins J.M., Chapman J.M. and Muday G.K. 2017. Abscisic acid-induces Reactive Oxygen Species are modulated by flavonols to control stomata apertura. *Plant Physiol.* 175: 1808-1825.
- Weijeres D., Schlereth A., Ehrismann J.S., Schwank G., Kientz M. and Jürgens G. 2006. Auxin triggers transient local signaling for cell specification in *Arabidopsis* embryogenesis. *Dev. Cell* 10: 265-270.
- Welters P., Takegawaos K., Emr D. and Chrispeels J. 1994. *AtVPS34*, a phosphatidylinositol 3-kinase of *Arabidopsis thaliana*, is an essential protein with homology to a calcium-dependent lipid binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 11298-11402.

- Welti R., Li W., Li M., Sang Y., Biesiada H., Zhou H., Rajashekar C., Williams T. and Wang X. 2002. Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase D alpha in freezing-induced lipid changes in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 277: 31994–32002.
- Whipps J.M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52: 487-511.
- Wilson Z.A. 2000. *The Arabidopsis. A Practical Approach*. Editorial Oxford University Press. 1-4.
- Wu Y., Shi L., Fu L., Liu Y., Xiong Y. and Sheen J. 2019. Integration of nutrient, energy, light and hormone signalling via TOR in plants. *J. Exp. Bot.* 70: 2227-2238.
- Wullschlegel S., Loewith R. and Hall M. 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124: 471–484.
- Xiong Y. and Sheen J. 2012. Rapamycin and glucose-Target of Rapamycin (TOR) protein signaling in plants. *J. Biol. Chem.* 287: 2836-2842.
- Xiong Y., McCormack M., Li L., Hall Q., Xiang C. and Sheen J. 2013. Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature* 496: 181-186.
- Yip C., Murata K., Walz T., Sabatini D. and Kang S. 2010. Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. *Mol. Cell* 38: 768-774
- Zhang T., Zhang Y., McFarlane H.E., Obata T., Richter A.S., Lohse M., Grimm B., Persson S., Fernie A.R. and Giavalisco P. 2018. Inhibition of TOR represses nutrient consumption, which improves greening after extended periods of etiolation. *Plant Physiol.* 178: 101-117.
- Zhou J.J and Lou J. 2018. The PIN-FORMED auxin efflux carriers in plant. *Int. J. Mol. Sci.* 19: 2759.
- Zhu K.M., Xu S., Li K.X., Chen S., Zafar S., Cao W., Wang Z., Ding L.N., Yang Y.H., Li Y.M and Tan X.L. 2019. Transcriptome analysis of the irregular shape of shoot apical meristem in *dt (dou tou)* mutant of *Brassica napus* L. *Mol. Breeding* 39: 39.
- Zoncu R., Efeyan A. and Sabatini D.M. 2011. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 21-35.