



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

LABORATORIO DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

“Mecanismos moleculares de las auxinas involucrados en el desarrollo radicular durante la interacción *Arabidopsis-Azospirillum brasilense* Sp245”

Tesis que presenta

Q.F.B. Jonanci Arreola Rivera

Para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Biología Experimental

Director de Tesis

D.C. Elda Beltrán Peña

Morelia Michoacán, Junio del 2018

Es bueno amar tanto como se pueda, porque ahí radica la verdadera fuerza y el que mucho ama realiza grandes cosas.

Vincent van Gogh.

RECONOCIMIENTOS

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 contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con el número de becario 598346 y de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH.

AGRADECIMIENTOS

Un logro profesional no solamente se alcanza a base de estrategias metodológicas, el apoyo moral y afectivo fortalece las relaciones humanas y nos impulsan a superar desafíos. Por ello, externo mi gratitud a quienes tuve la dicha de conocer y me apoyaron para concluir esta etapa de mi vida.

A mi asesora: La D.C. Elda Beltrán Peña, por recibirme en su laboratorio de Transducción de Señales, facilitándome todas las herramientas y su tiempo para el desarrollo de mi trabajo.

A mi comité tutorial: Doctores Homero Reyes de la Cruz, Rafael Salgado Garciglia, Eduardo Valencia Cantero y en especial al D.C. Josué Altamirano Hernández por el apoyo, y principalmente porque nunca dudó que lograría mí objetivo. En general muchas gracias a todos por acceder a ser parte de mi comité de evaluación y contribuir en los seminarios de evaluación con sus consejos y observaciones.

A mis padres: José Luis Arreola Hernández y Silvia Rivera Oribio porque un padre no es aquel que da la vida, eso sería demasiado fácil, sino el que da todo su amor y apoyo para poder verte feliz. En especial a mi mamá por cada consejo que me dio y mostrarme que el mejor camino es aquel en el que nunca te rindes. Gracias padres por apoyarme incondicionalmente en esta etapa de mi vida, por todo el trabajo, esfuerzo y sacrificio que han hecho por mí, todo lo que soy es por ustedes, gracias por enseñarme que sin constancia no hay superación, los amo tanto.

A mis hermanos: José Luis, Diana y Lupita que a pesar de que nunca comprendieron con claridad que estuve haciendo todo este tiempo nunca dudaron que lo lograría y a su forma me mostraron su cariño. Nunca duden que los adoro con todo mi corazón ya que son una bendición muy grande para mí, los quiero mucho.

A mi novio: Enrique Esquivel García, por ser mi mayor inspiración de lucha y constancia, ya que fuiste el que me ayudo en mis días más oscuros y viviste de cerca este proceso de aprendizaje. Muchas gracias por esos consejos que necesitaba escuchar en el momento correcto, por todo tu apoyo, nunca dejaste que me derrumbara, gracias por procurarme, cuidarme y quererme tanto por enseñarme a ser una mejor persona. Este logro es también tuyo amor.

A mis amigas: Alejandra, Nallely y Kassandra porque más que amigas fueron mis confidentes, muchas gracias por todo lo vivido porque sin ustedes esta travesía hubiera sido muy pesada y aburrida, gracias por su tiempo, sus consejos, por cada momento vivido que me ayudo a mejorar como persona. Porque dicen que tu segunda familia son tus amigos y no lo dudo, las quiero muchísimo chiquillas

A mis amigos: Victor, Karen, Lupita, la maestra Martha, Liz, Saraí y Elizabeth que en tan poco tiempo ha sido una gran amiga, muchas gracias a todos por ayudarme a culminar este trabajo con sus consejos y todo su apoyo incondicional.

A mi generación de maestría: Integrada por Mariana, Xochitl, Rosi, Kass, Nalle, Martita, Iñaki, Chucho chuchin, Dany y Brayan, fueron un gran equipo y me alegra que se haya dado una buena interacción con todos como grupo y además logramos establecer lazos de amistad, les deseo a cada uno mucho éxito en su plan de vida.

Por último solo me resta decir gracias a dios y a la vida, porque a pesar de que es corta, es necesario romper las reglas, perdonar rápidamente, besar lentamente, amar de verdad, reír incontrolablemente y nunca lamentarse nada de lo que te hizo sonreír.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta adulta de <i>Arabidopsis thaliana</i>	4
Figura 2. Los mecanismos celulares involucrados en el desarrollo de la raíz primaria de <i>Arabidopsis</i>	6
Figura 3. Patrón radial de la punta de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> ,.....	7
Figura 4. Cruce de señales entre las citocininas y las auxinas que determina el tamaño del meristemo radicular de <i>Arabidopsis thaliana</i>	9
Figura 5. Desarrollo de las raíces laterales de <i>Arabidopsis thaliana</i>	11
Figura 6. Las auxinas controlan el desarrollo de las RL a través de múltiples módulos de señalización.....	12
Figura 7. Etapas del desarrollo de la raíz lateral.....	13
Figura 8. Procesos del ciclo de vida de <i>A. thaliana</i> controlados por auxinas.....	15
Figura 9. Vía de respuesta a las auxinas.....	16
Figura 10. Homeostasis de las auxinas.....	18
Figura 11. Transporte de las auxinas.....	20
Figura 12. Vía de señalización de las auxinas.....	21
Figura 13. Vía de respuesta a las citocininas.....	23
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>	24
Figura 15. La ruta de señalización del etileno.....	26
Figura 16. Control hormonal y genético de la formación de las raíces laterales en <i>Arabidopsis</i>	27
Figura 17. <i>Azospirillum brasilense</i>	29
Figura 18. Las bacterias influyen sobre la fisiología vegetal y el desarrollo de la arquitectura radicular de las plantas.....	30
Figura 19. Efecto de la interacción planta-PGPR.....	31
Figura 20. Efecto de la inoculación de <i>Arabidopsis</i> con <i>Azospirillum brasilense</i> silvestre y la mutante FAJ009.	32
Figura 21. Efecto de diferentes concentraciones de <i>A. brasilense</i> Sp245 sobre el desarrollo radicular de <i>Arabidopsis</i>	43
Figura 22. Efecto de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp245 sobre la arquitectura radicular de <i>Arabidopsis</i>	44
Figura 23. Efecto de diferentes tiempos de exposición a <i>Azospirillum</i> sobre la arquitectura radicular de <i>A. thaliana</i>	45
Figura 24. Desarrollo de los primordios de las raíces laterales de <i>Arabidopsis</i> en presencia de <i>Azospirillum</i>	46
Figura 25. Efecto de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp245 sobre el nivel de auxinas en las raíces de <i>A. thaliana</i>	48
Figura 26. <i>Azospirillum brasilense</i> Sp245 altera la expresión de <i>CycB1::uidA</i> en la raíz de <i>Arabidopsis</i>	49

Figura 27. Expresión del marcador <i>EXP7::uidA</i> en la raíz de <i>Arabidopsis</i> en presencia de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp245.....	51
Figura 28. Efecto de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp245 sobre la arquitectura radicular en las mutantes de <i>Arabidopsis</i>	53
Figura 29. Efecto de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp245 sobre la arquitectura radicular de las mutantes <i>axr4-1</i> y <i>ben2</i> de <i>Arabidopsis</i>	55
Figura 30. Efecto de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp245 sobre la arquitectura radicular de las mutantes <i>pgp1</i> , <i>pgp4</i> y <i>pgp19</i> de <i>Arabidopsis</i>	56
Figura 31. Efecto de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp245 sobre la arquitectura radicular de <i>Arabidopsis</i> en presencia del inhibidor NPA.....	58
Figura 32. Efecto de <i>Azospirillum</i> sobre la arquitectura radicular de las mutantes del receptor de las citocininas de <i>A. thaliana</i>	59
Figura 33. Efecto de <i>Azospirillum</i> sobre la arquitectura radicular de las mutantes de señalización del etileno de <i>A. thaliana</i>	61

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Características de la planta modelo <i>Arabidopsis thaliana</i>	3
2.2 Órganos que conforman el sistema radicular de <i>Arabidopsis</i>	5
2.2.1 Crecimiento de la raíz primaria de <i>Arabidopsis</i>	8
2.2.2 Desarrollo de las raíces laterales de <i>Arabidopsis</i>	10
2.3 Reguladores de crecimiento	14
2.3.1 Las auxinas	14
2.3.2. Vía de respuesta a las auxinas	15
2.3.3 Homeostasis de las auxinas: biosíntesis, conjugación y degradación	17
2.3.4 Transporte polar de las auxinas	18
2.3.5 Vía de señalización de las auxinas	20
2.4 Las citocininas (CK).....	22
2.4.1 El cruce de señales entre las auxinas y las citocininas	24
2.5 El etileno	25
2.5.1 Interacción auxinas-etileno	26
2.6. La rizosfera: Un entorno dinámico con actividad metabólica y microbiológica.....	28
2.7 Características de <i>Azospirillum brasilense</i>	28
2.8 Interacción planta- <i>Azospirillum</i>	31
2.8.1. Interacción <i>Arabidopsis</i> - <i>Azospirillum</i>	32
3. JUSTIFICACIÓN.....	33
4. HIPÓTESIS	33
5. OBJETIVOS	34
5.1 Objetivo general	34
5.2 Objetivos específicos.....	34
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
6.1 Material vegetal.....	35

6.2 Métodos.....	35
6.2.1 Desinfección, siembra e incubación de las semillas.....	35
6.2.2 Preparación del medio de cultivo	36
6.2.3 Preparación del medio de cultivo inoculado con <i>Azospirillum</i> Sp245	36
6.2.4 Transferencia de las plántulas a medios de cultivo suplementados con <i>Azospirillum</i> <i>brasileense</i> Sp245	37
6.2.5 Transferencia de las plántulas a medios de cultivo suplementados con NPA (ácido N-1- naftiltalámico) y <i>Azospirillum</i> <i>brasileense</i> Sp245	37
6.2.6 Actividad histoquímica <i>uidA</i>	37
6.2.7 Evaluación de la arquitectura radicular de las plántulas	38
6.2.8 Análisis estadístico.....	38
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	39
8. RESULTADOS	42
8.1 Efecto de diferentes concentraciones de <i>Azospirillum</i> <i>brasileense</i> Sp245 sobre la arquitectura radicular de <i>Arabidopsis</i>	42
8.2 Efecto de <i>Azospirillum</i> <i>brasileense</i> Sp245 sobre el desarrollo de los primordios de las raíces laterales de <i>Arabidopsis</i>	45
8.3 <i>Azospirillum</i> altera el nivel de las auxinas en la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i>	47
8.4 Efecto de <i>Azospirillum</i> <i>brasileense</i> Sp245 sobre la división celular de los meristemas de la raíz de <i>Arabidopsis</i>	49
8.5 Influencia de <i>Azospirillum</i> <i>brasileense</i> Sp245 sobre la elongación celular en la raíz de <i>Arabidopsis</i>	50
8.6 Participación de algunos componentes de la vía de respuesta a las auxinas en la interacción <i>Arabidopsis</i> - <i>Azospirillum</i>	51
8.7 <i>Azospirillum</i> <i>brasileense</i> Sp245 estimula el desarrollo de las raíces laterales de <i>Arabidopsis</i> a través de proteínas que participan en la localización de los acarreadores de auxinas.....	54
8.8 Participación de la citocininas en el efecto de <i>Azospirillum</i> sobre el desarrollo de la arquitectura radicular de <i>Arabidopsis</i>	58
8.9 Participación del etileno sobre el efecto de la interacción <i>Arabidopsis</i> - <i>Azospirillum</i>	60
9. RESUMEN DE RESULTADOS.....	62
10. DISCUSIÓN.....	63
11. CONCLUSIONES.....	70
12. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO.....	71
13. BIBLIOGRAFÍA	72

RESUMEN

Azospirillum brasilense Sp245 es una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal que vive en el suelo y sobre las raíces de las plantas y produce la auxina natural AIA entre otros fitorreguladores. La vía de respuesta a las auxinas comprende una gran cantidad de elementos, que van desde la homeostasis del AIA hasta la transcripción de genes de respuesta a auxinas. En este estudio, se estableció la interacción de *Azospirillum-Arabidopsis* y se analizó el efecto de la bacteria sobre los cambios de la arquitectura radicular. Se determinó que la bacteria disminuye el crecimiento de la raíz primaria (RP) e incrementa el desarrollo de las raíces laterales (RL) de manera similar al fenotipo que se presenta con altas concentraciones de auxinas. Siendo el AIA la auxina preponderante producida por esta bacteria, se determinaron los elementos de la vía de respuesta a las auxinas que podrían estar implicados durante dicha interacción, analizando las líneas mutantes de *Arabidopsis* en síntesis, transporte y señalización de las auxinas. Los resultados mostraron que todas las mutantes fueron igualmente sensibles a *Azospirillum* que la línea silvestre a la disminución del crecimiento de la RP. Respecto al desarrollo de las RL, la triple mutante del receptor de las auxinas *tir1afb2afb3* resultó hipersensible a la presencia de la bacteria, lo que sugiere que *Azospirillum* podría estar regulando negativamente dicho desarrollo. Por otra parte, el represor SLR1/IAA14 y los factores de transcripción ARF7 y ARF19 fueron indispensables en la estimulación del desarrollo de las RL, al igual que el transportador PGP1 y, las proteínas AXR4 y BEN2 que participan en la localización correcta de los transportadores AUX1 y PIN respectivamente. Se observó que en la estimulación del desarrollo de las RL también se requiere de la señalización de las citocininas y de la vía de respuesta a etileno. Además, con las líneas reporteras *CyclB1::uidA* y *Exp7::uidA* se observó que la detención del crecimiento de la RP de *Arabidopsis* en presencia de la bacteria se debe a un arresto de la división celular del meristemo y a la desaparición de la zona de elongación de la raíz durante los primeros días de la interacción.

Palabras clave: Auxinas, *Azospirillum*, *Arabidopsis*, Rizobacteria, Citocininas.

ABSTRACT

Azospirillum brasilense Sp245 is a plant growth promoting rhizobacterium that lives in soil and on plants root and produces the auxin natural AIA among others phytohormones. The response pathway auxin comprises a large number of elements, ranging from hormone homeostasis to transcription of auxin response genes. In this study the interaction *Azospirillum-Arabidopsis* was established and bacteria effect on root architecture changes was analyzed. It was determined that bacterium decreases the growth of root primary (RP) and increases lateral roots (RL) development in a similar way to phenotype that occurs with high auxin concentrations. Since AIA is predominant auxin produced by this bacterium, we wanted to determine which elements of auxin pathway could be involved during this interaction, for which mutant lines in synthesis, transport and signaling of auxin of *Arabidopsis* were analyzed. The results showed that all mutants were equally sensitive to *Azospirillum* than wild-type line to RP growth decrease. About to development RL, triple mutant of the auxin receptor *tir1afb2afb3* was hypersensitive to presence of bacteria, suggesting that *Azospirillum* could be negatively regulating this development. On the other hand, the repressor SLR1 / IAA14 and transcription factors ARF7 and ARF19 were indispensable in stimulation of development RL, alike the PGP1 transporter and, AXR4 and BEN2 proteins that participate in correct localization of the transporters AUX1 and PIN respectively. It was observed that stimulation of RL development also requires signaling of cytokinins and ethylene response pathway. Interestingly, using the reporter lines *CycB1::uidA* and *Exp7::uidA* we found that RP growth arrest of *Arabidopsis* in presence of bacteria is due to an arrest of meristem cell division and disappearance of elongation zone of root during the first days of interaction.

Key words: Auxins, *Azospirillum*, *Arabidopsis*, Rhizobacterium, Cytokinins.

1. INTRODUCCIÓN

El sistema radicular es el órgano de las plantas que interacciona con los diversos microorganismos que se encuentran en el suelo. Los microorganismos pueden regular la arquitectura de la raíz mediante la secreción de diferentes moléculas y de esta manera presentar 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 de las plantas (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 que produce (Lugtenberg y Kamilova, 2009; Spaepen *et al.*, 2009; Spaepen *et al.*, 2014), las cuales modifican la morfología de la raíz de las plantas, disminuyendo la longitud de la raíz primaria e incrementando el número de las raíces laterales y de los pelos radiculares. Esto promueve un aumento en la toma de agua y nutrientes, lo que induce un mejor crecimiento de las plantas (Dobbelaere *et al.*, 2003). La vía de señalización de las auxinas involucra una gran cantidad de procesos que van desde la homeostasis de la hormona hasta la transcripción de genes de respuesta a las auxinas (Strader y Zhao, 2016). Debido a que *Azospirillum* produce auxinas y otros fitorreguladores. En el presente estudio se determinaron los elementos de la vía de respuesta a auxinas y otros fitorreguladores que están involucrados en los cambios de la arquitectura radicular de *Arabidopsis*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Características de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*

A. thaliana es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia *Brassicaceae*, endémica de Europa, Asia central y del noroeste de África. Desde la década de los 80's *A. thaliana* se ha utilizado ampliamente en investigaciones sobre los mecanismos moleculares que regulan el desarrollo vegetal (Meinke *et al.*, 2015). Esta planta crece en suelos bien drenados y ricos en materia orgánica (Wilson, 2000; Weigel y Glazebrook, 2002). El ciclo de vida de *A. thaliana* desde la germinación hasta la senescencia se completa en ocho semanas, produciendo grandes cantidades de semillas y su crecimiento no depende de ninguna época

del año (Wilson, 2000). El genoma de *Arabidopsis* está constituido por 125 millones de pares de bases y contiene aproximadamente 25,000 genes. La planta adulta de *Arabidopsis* está formada por hojas que forman una roseta de aproximadamente de 2-4 cm de diámetro de la cual se desprende un tallo floral que puede alcanzar una altura de 20-70 cm, las hojas caulinas se presentan a lo largo del tallo, además se puede observar vainas alargadas denominadas silicuas. Las inflorescencias se presentan en racimos, en el extremo del tallo, donde se van separando unas de otras a medida que el tallo crece (Fig. 1).

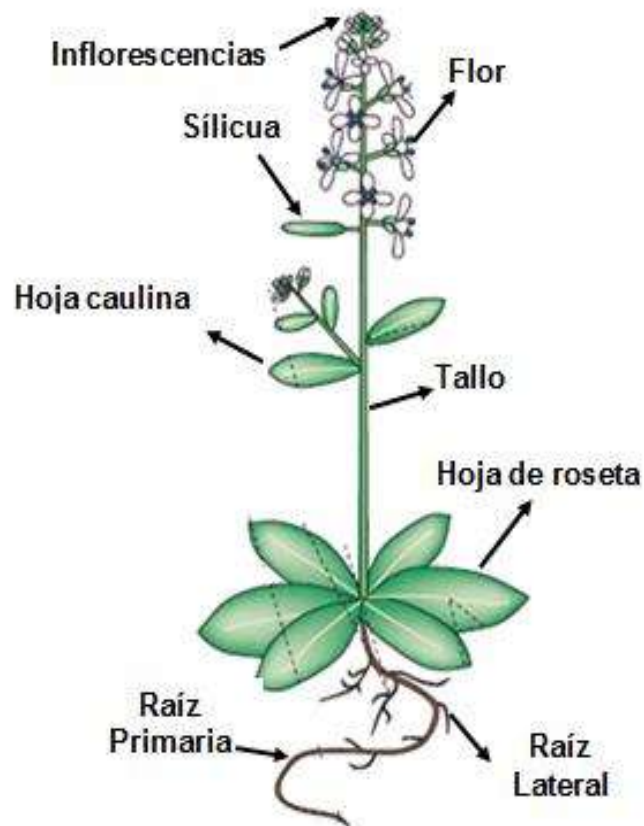


Figura 1. Planta adulta de *Arabidopsis thaliana*. Esta planta tiene un ciclo de vida de 6-8 semanas, presenta una pequeña roseta en la etapa vegetativa a partir de la cual crecen los tallos florales y se producen los frutos denominados silicuas que contienen alrededor de 50 semillas (Wilson, 2000).

2.2 Órganos que conforman el sistema radicular de *Arabidopsis*

La raíz es la parte de la planta que está anclada al suelo y sirve para explorar el sustrato (ya sea en profundidad o en las capas más superficiales del suelo) y extraer los nutrientes y agua requerida para su crecimiento (López-Bucio *et al.*, 2003). La arquitectura radicular de *A. thaliana*, comprende la raíz primaria, los pelos radiculares y las raíces laterales. El crecimiento continuo de la raíz primaria se debe a la actividad proliferativa del meristemo (López-Bucio *et al.*, 2009). Las raíces de *A. thaliana* presentan cuatro zonas distintas, la zona meristemática (ZM) que es la más cercana a las células de la columela (caliptra), mide alrededor de 200 μm y se caracteriza por tener células con alta actividad mitótica que regeneran los distintos tipos de células que conforman a la raíz. Enseguida en la zona de transición (ZT) que abarca 320 μm , las células comienzan a crecer lentamente tanto en amplitud como en longitud para posteriormente alargarse de manera rápida en la zona de elongación (ZE), la cual mide aproximadamente 330 μm . Finalmente en la zona de diferenciación (ZD) de 650 μm de longitud y la más distal a la columela, las células dejan de crecer y alcanzan un estado maduro, donde solo algunas células epidérmicas (tricoblastos) continúan su crecimiento para desarrollar los pelos radiculares (Fig. 2) (Barrada *et al.*, 2015).

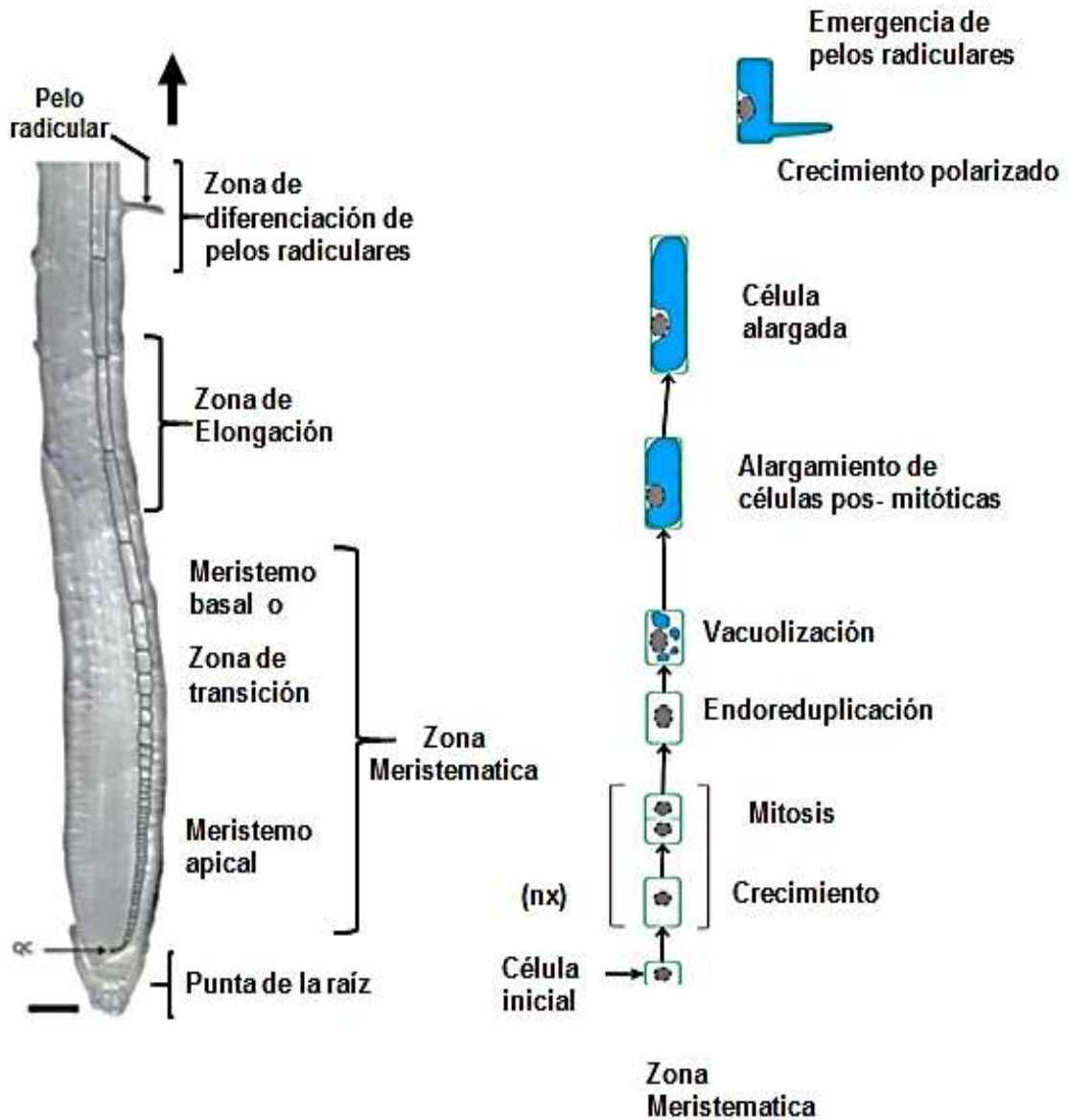


Figura 2. Los mecanismos celulares involucrados en el desarrollo de la raíz primaria de *Arabidopsis*. La raíz primaria de *Arabidopsis* muestra las diferentes zonas que la conforman: Zona Meristemática (ZM); de Transición (ZT) y de Elongación (ZE). Finalmente en la zona de diferenciación (ZD) las células se diferencian formando los pelos radiculares (Barrada *et al.*, 2015).

Tanto la raíz primaria como las raíces laterales están conformadas por distintos tipos de capas celulares: epidermis, córtex, endodermis, periciclo, haz vascular y la columela. La epidermis, el córtex y la endodermis presentan un arreglo de cilindros concéntricos que rodean al periciclo y a los haces vasculares. 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. 3). Todos los tejidos de la raíz surgen a partir de un conjunto de células que se encuentran en el ápice, denominadas Células Iniciales (CI) 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 Centro Quiescente (QC). Al QC rodeado por las células iniciales se le denomina nicho de células fuente (Barrada *et al.*, 2015).



Figura 3. Patrón radial de la punta de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Corte longitudinal de la raíz primaria de *Arabidopsis* donde se puede observar la organización de las células iniciales a partir de las cuales se forman todos los tejidos de la raíz (Barrada *et al.*, 2015).

2.2.1 Crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis*

La formación de la raíz primaria ocurre desde la embriogénesis, cuando el embrión se polariza estableciendo los meristemos apical y radicular, los cuales son las estructuras proliferativas que darán origen al follaje en el extremo superior y a la raíz en el extremo inferior respectivamente (Mansfield y Briarty, 1991). Una vez que el meristemo apical de la raíz (RAM) se constituye durante la embriogénesis, se encuentra listo para proveer nuevas células para el crecimiento y el aumento en biomasa radicular. 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 o fitohormonas también son llamadas reguladores del crecimiento vegetal debido a su característica principal de estimular programas de organogénesis, es decir, cada aspecto del ciclo de vida de las plantas está bajo el control hormonal (Gray *et al.*, 1998). Entre las fitohormonas que controlan el crecimiento y el desarrollo destacan las auxinas, principalmente el ácido indol 3-acético (AIA) y las citocininas (CK) ambas involucradas en el crecimiento de la raíz primaria de forma antagónica. Las CK a través de los factores de transcripción ARR1 tipo B entre otros, promueven la expresión del represor IAA3/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 al 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 nicho de células fuente (Fig. 4) (Schaller *et al.*, 2015).

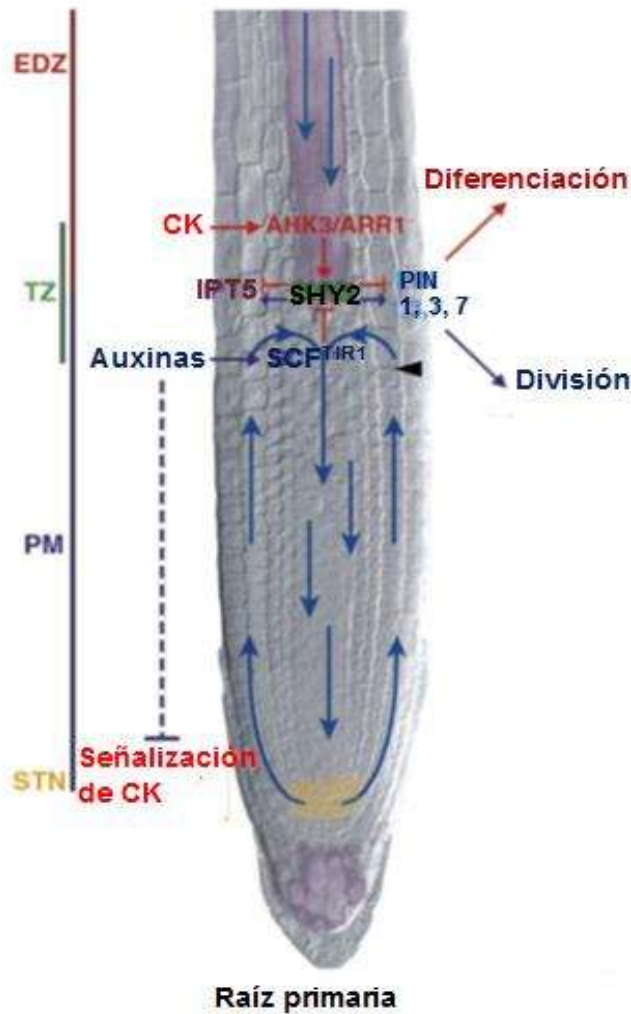


Figura 4. Cruce de señales entre las citocininas y las auxinas que determina el tamaño del meristemo radicular de *Arabidopsis thaliana*. El esquema muestra un corte longitudinal de la raíz primaria donde se señala en color amarillo el nicho de células fuente (STN), donde a partir de las células iniciales se forman todos los tejidos de la raíz. Se muestra el Meristemo Proximal (PM); la zona de Diferenciación-Elongación (EDZ) y la Zona de Transición (TZ). La cabeza de flecha indica el córtex en la TZ, las flechas azules representan la dirección del flujo de auxinas regulado por los transportadores PIN. En el tejido vascular de la TZ, la activación de la expresión de *SHY2* mediada por las CK a través de la vía de dos componentes *AHK3/ARR1* permite la baja expresión de los genes que codifican para los transportadores *PIN1*, *PIN3* y *PIN7* y la diferenciación celular. Por el contrario, las auxinas median la degradación de *SHY2*, la cual permite la síntesis de los PIN y la división celular. En el STN, las auxinas reprimen la señalización de las CK activando a los ARR tipo A (línea azul punteada) y promueven de esta manera la división celular (Moubayidin *et al.*, 2009).

2.2.2 Desarrollo de las raíces laterales de *Arabidopsis*

Las raíces laterales (RL) son órganos post-embrionarios que se forman en la zona de diferenciación a partir de células del periciclo posicionadas en forma adyacente a los polos del xilema. Las RL son esenciales en el desarrollo del sistema radicular porque participan en la absorción de nutrientes y agua. La iniciación de las RL ocurre en la zona de diferenciación donde las células del periciclo no se están dividiendo, pero una vez estimuladas por las auxinas, las células maduras del periciclo se desdiferencian y proliferan formando un primordio de la raíz lateral (PLR). 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 primación, las células del periciclo localizadas en la zona oscilatoria (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 primordios de RL, 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, ambas divisiones generan varias capas dando lugar al primordio de la RL. Finalmente en la etapa de elongación el primordio emerge rompiendo las diferentes capas de la raíz primaria y se elonga formando la nueva raíz lateral (Fig. 5) (Laskowski y Ten Tusscher, 2017).

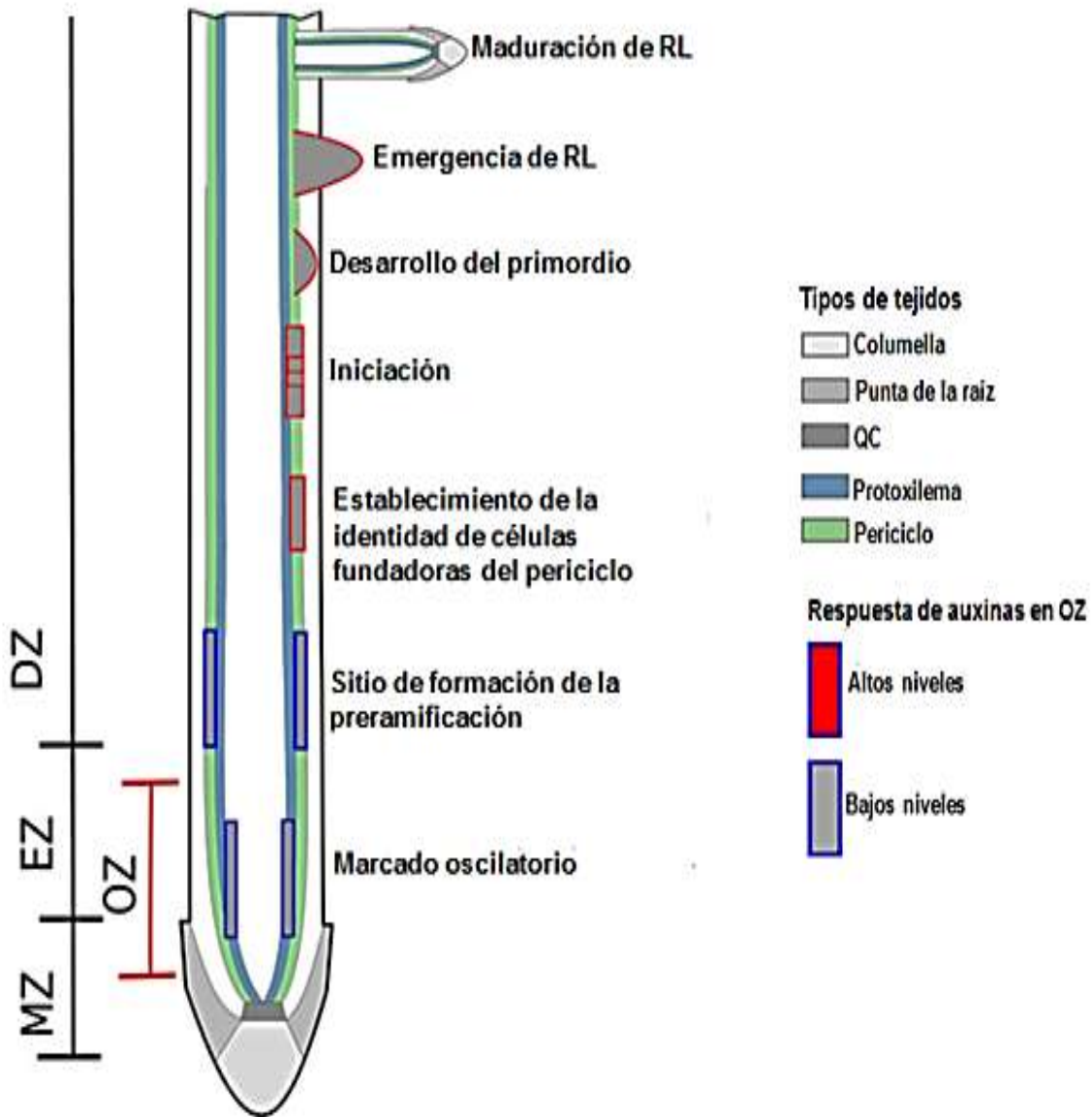


Figura 5. Desarrollo de las raíces laterales de *Arabidopsis thaliana*. El esquema muestra el desarrollo de una raíz lateral de *A. thaliana* desde la zona meristémica (MZ) de la raíz primaria transitando hacia la oscilatoria (OZ) donde las células fundadoras del periciclo son marcadas en respuesta a las auxinas. En la zona de diferenciación (DZ) 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 promoviendo así el desarrollo del primordio de la raíz lateral hasta su emergencia (Laskowski y Ten Tusscher, 2017).

Como se mencionó anteriormente el desarrollo de las raíces laterales, ocurre a partir de células del periciclo de la raíz primaria (Tian *et al.*, 2014). Este proceso es regulado por las auxinas mediante diferentes módulos de señalización de auxinas. En cada módulo del desarrollo de las RL, las auxinas al ser reconocidas por sus receptores nucleares TIR1/AFBs, promueven la unión de éste con diferentes represores AUX/IAA. Posteriormente, TIR1 que forma parte del complejo SCF^{TIR1/AFB} desencadena la ubiquitinación y la degradación de los represores AUX/IAA en el proteosoma 26S, liberando de esta manera a los factores de transcripción ARFs y promoviendo la expresión de los genes de respuesta a auxinas (Fig. 6) (Wang y Estelle, 2014; Schaller *et al.*, 2015)

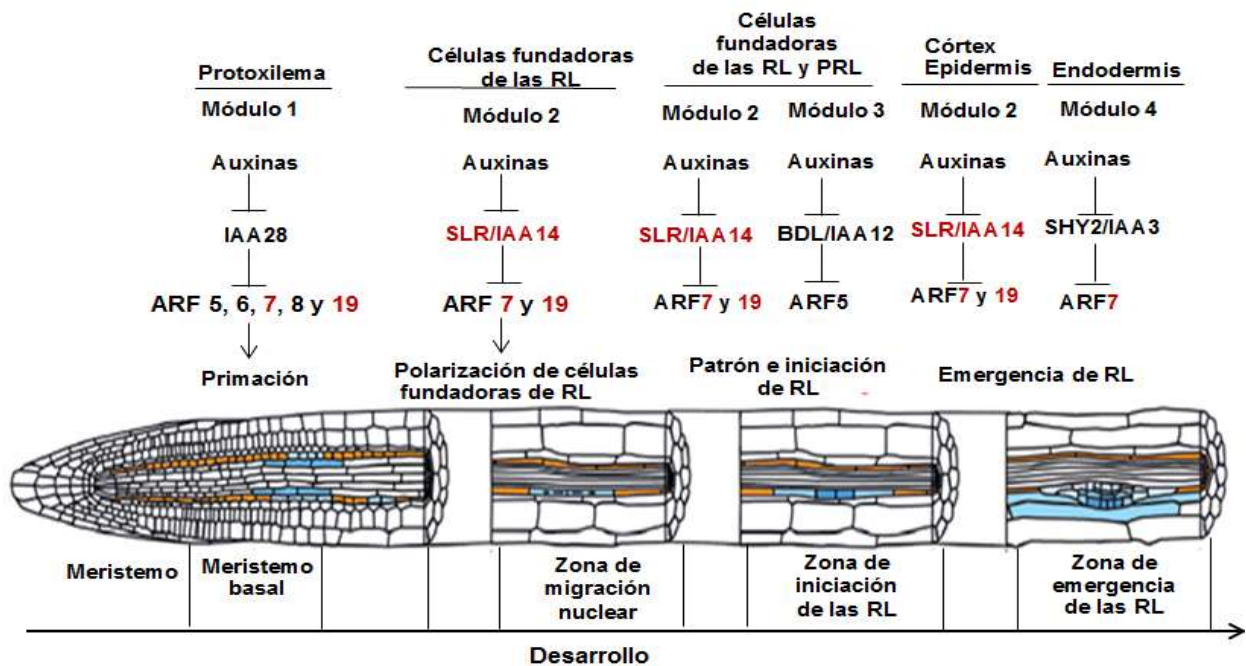


Figura 6. Las auxinas controlan el desarrollo de las RL a través de múltiples módulos de señalización. El esquema muestra la raíz primaria de *Arabidopsis* donde se indican los diferentes módulos de señalización regulados por las auxinas durante el desarrollo de las RL. En el módulo 1, en el protóxilema las auxinas promueven la degradación del represor IAA28 y la liberación de los factores ARF5, 6, 7, 8 y 19 implicados en la primación, donde las células fundadoras del periciclo son marcadas en el meristemo basal. En el módulo 2, a través de las auxinas, SLR/IAA14 es degradado y entonces libera 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 BDL/IAA12 y liberan al factor 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 módulo 4, a través de la vía de las auxinas se degrada a 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).

El desarrollo de los primordios de las raíces laterales de *Arabidopsis* empieza desde su iniciación, la cual ocurre cuando dos células iniciales del periciclo dentro de la misma fila experimenta divisiones transversales asimétricas polarizadas (Péret *et al.*, 2009). Una serie idéntica de divisiones mitóticas ocurre en ambas células, formando una fila de 8 a 10 células cortas. Después de un periodo de expansión radial, ocurre una división longitudinal en las células centrales, originando un primordio de dos capas, la cual se define como la etapa II. Durante la etapa III, la capa externa se divide longitudinalmente para formar una tercera capa. Una vez más, algunas células en los extremos de la segunda capa no se dividen, lo que ocasiona que la estructura comience a formar un domo. Posteriormente, la capa interna se divide originando un primordio de cuatro capas que penetra el tejido endodérmico de la raíz parental donde se está formando el primordio en la etapa IV. En las tres etapas siguientes, las divisiones transversales y longitudinales continúan y el primordio atraviesa los tejidos del córtex (etapa V) y de la epidermis (etapa VI) hasta que emerge de la raíz parental durante la etapa VII (Fig. 7) (Malamy y Benfey, 1997).

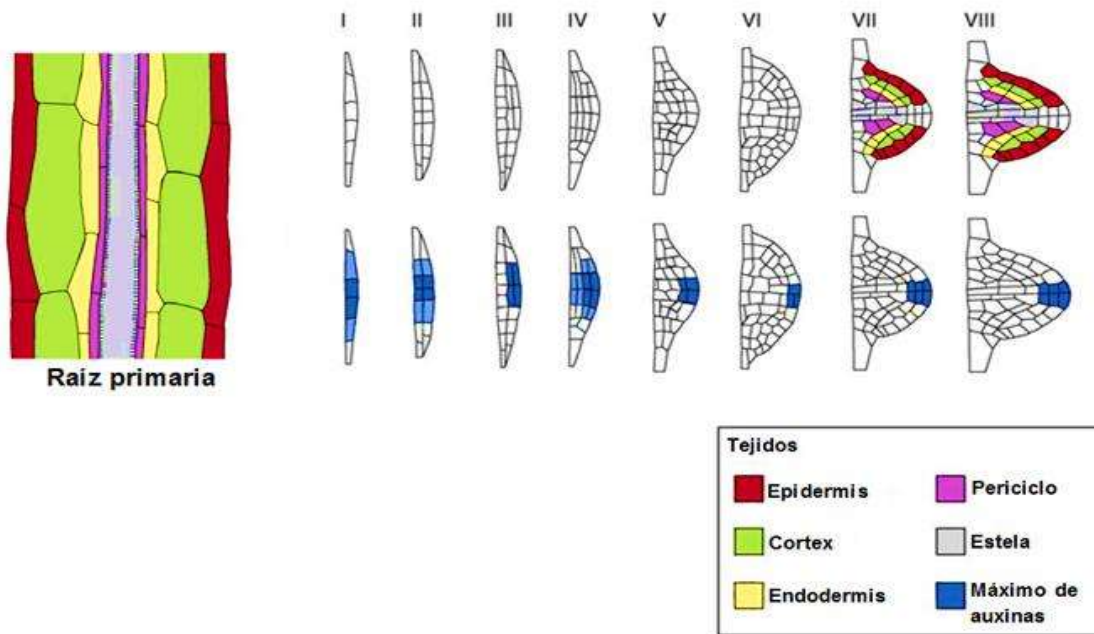


Figura 7. Etapas del desarrollo de la raíz lateral. En la etapa I, el primordio surge como resultado de las divisiones en el periciclo. Durante la etapa II, las células se dividen periclinalmente para formar otra capa. En la etapa III, la forma de domo del primordio de la raíz lateral se debe a las divisiones periclinales de la capa más externa. Los primordios de tres, cuatro, o cinco capas visibles se pueden observar en las etapas III, IV y V respectivamente. En esta última, las células de todas las capas experimentan divisiones anticlinales para generar un primordio que comienza a empujar a través de la capa del córtex de la raíz primaria. En las etapas VI y VII el meristemo se consolida y la nueva raíz emerge y activa su crecimiento (Péret *et al.*, 2009).

2.3 Reguladores de crecimiento

Diversos reguladores del crecimiento como las auxinas, citocininas, brasinoesteroides, giberelinas, ácido abscísico, etileno, ácido jasmónico y ácido salicílico coordinan los programas de organogénesis. La función que desempeñan estas fitohormonas tiene gran relevancia desde la embriogénesis hasta la senescencia vegetal. Los procesos antes mencionados, están finamente regulados por diversas vías de transducción de señales (Saini *et al.*, 2013; Pacifici *et al.*, 2015). Cabe mencionar que la actividad de cada hormona vegetal se determina por su disponibilidad (controlada a nivel del metabolismo y distribución), por la eficiencia en su percepción y la posterior transducción de señales, por lo tanto las alteraciones en alguno de estos eventos impactarán sobre la función hormonal (Vanstraelen y Benková, 2012).

2.3.1 Las auxinas

El nombre de auxinas deriva de la palabra griega *auxein* que significa crecer. Las auxinas son un grupo de reguladores de crecimiento que participan en la mayoría de los procesos de desarrollo de la planta (Dobbelaere *et al.*, 2003) (Fig. 8). Estas moléculas intervienen en la reproducción, embriogénesis, elongación del hipocótilo, crecimiento de la raíz primaria, formación de raíces laterales y de pelos radiculares, además de regular las respuestas a los tropismos dependientes de la luz y la gravedad. Las auxinas son sintetizadas en los meristemas de las hojas jóvenes y en el meristemo apical de la raíz (Gray *et al.*, 1998; Vanneste y Friml, 2009) y son necesarias desde la etapa temprana de la embriogénesis donde definen el cuerpo apical y basal de la planta. Posteriormente, la parte basal del embrión se dividirá para formar las células de la hipófisis y del suspensor, la primera dará lugar al QC y al meristemo apical de la raíz (RAM) y la segunda a la columela. Las auxinas controlan el desarrollo a través de su distribución diferencial entre las células de un tejido (Cederholm *et al.*, 2012). Cuando las auxinas se acumulan en una sola célula o en un grupo pequeño de células, esto se denomina máximo de auxinas, pero si la zona donde se acumulan las auxinas presenta una concentración gradual a lo largo del tejido, se conoce

como un gradiente de auxinas. Estos tipos de acumulaciones de auxinas pueden obtenerse mediante su síntesis en tejidos específicos, conjugación o degradación y su re-direccionamiento por medio de transportadores (Vanneste y Friml, 2009).

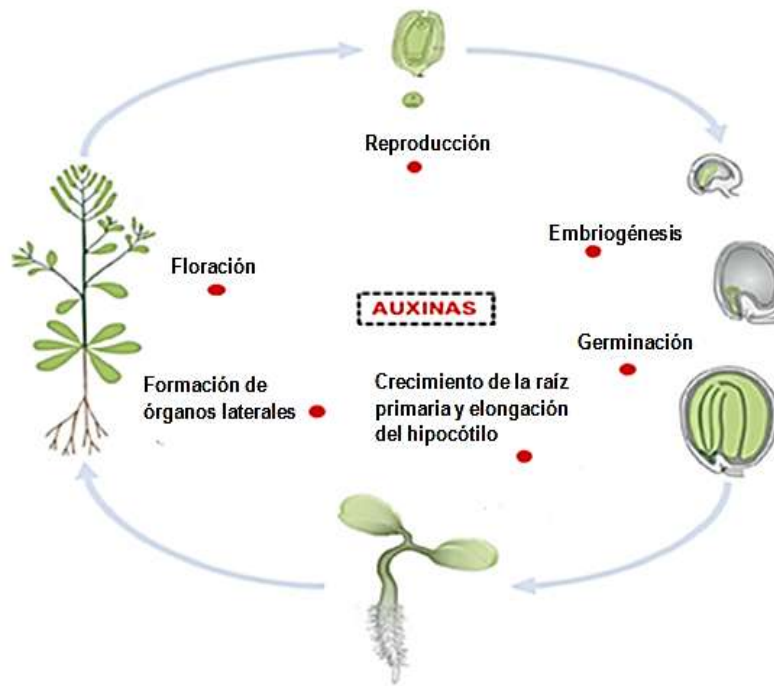


Figura 8. Procesos del ciclo de vida de *A. thaliana* controlados por auxinas. Con puntos rojos se señalan los procesos de desarrollo donde participan las auxinas. Las auxinas regulan la división y expansión celular, la formación de la raíz, el fototropismo, el gravitropismo, la dominancia apical y el desarrollo del fruto (Gray *et al.*, 1998; Vanneste y Friml, 2009).

2.3.2. Vía de respuesta a las auxinas

Las auxinas son moléculas pequeñas con capacidad para estimular el crecimiento de las plantas; su actividad está regulada principalmente a tres niveles: homeóstasis, transporte y señalización (Fig. 9) (Schaller *et al.*, 2015). Las auxinas se sintetizan en el ápice del follaje, hojas jóvenes y meristemo de la raíz (Ljung *et al.*, 2005) y desde dichos sitios se redistribuyen a otros tejidos donde afectan una gran variedad de procesos del desarrollo vegetal como: la formación de raíces laterales, la dominancia apical, el desarrollo de hojas y flores y las respuestas a estímulos ambientales (Ljung *et al.*, 2005).

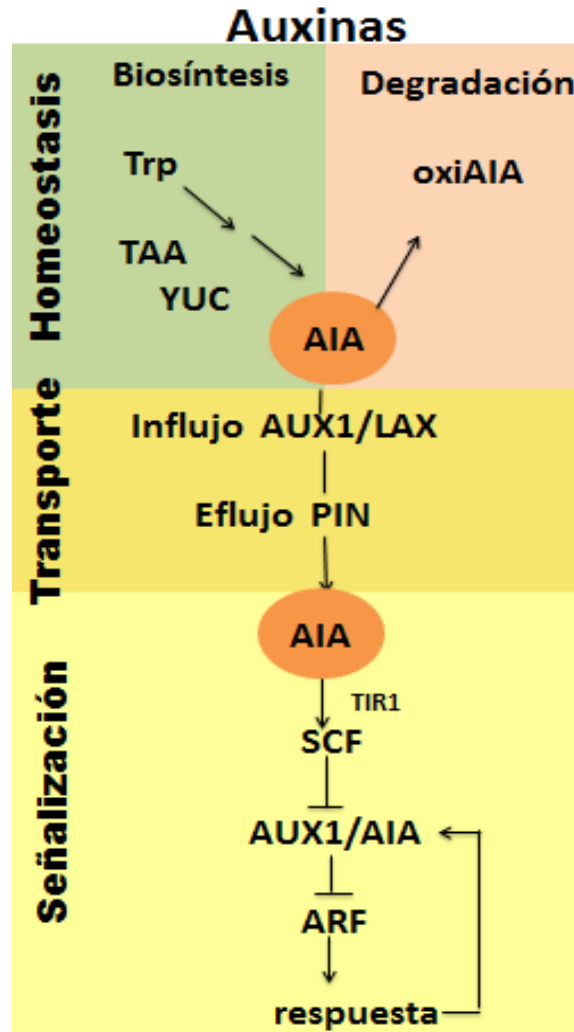


Figura 9. Vía de respuesta a las auxinas. La homeostasis celular de las auxinas es alcanzada por la síntesis, conjugación y catabolismo. El AIA es sintetizado mayoritariamente en los meristemos de las hojas jóvenes, la conjugación se establece por la unión del AIA a aminoácidos como la Ala, Leu y Glu y su degradación por oxidación. El transporte polar de las auxinas célula a célula ocurre por los transportadores de influjo y eflujo. El primero se lleva a cabo por las proteínas AUX1, mientras que el de eflujo por las PIN y los transportadores ABCB localizados en la membrana plasmática. Las auxinas se unen al receptor nuclear TIR1, permitiendo la interacción de este último con los represores Aux/IAAs para promover su ubiquitinación, degradación y la subsecuente liberación de los factores ARFs que promueven la transcripción de los genes de respuesta a auxinas (Schaller *et al.*, 2015).

2.3.3 Homeostasis de las auxinas: biosíntesis, conjugación y degradación

La homeostasis de las auxinas es el resultado de los ajustes múltiples y dinámicos en los mecanismos de regulación, con la finalidad de mantener un equilibrio interno relativamente estable, lo 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). Existen auxinas producidas de forma natural como: el AIA y el ácido indol-3-butírico (AIB) y las auxinas sintéticas como el ácido 1-naftalén-acético (ANA), el indol-3 etanol (IET), el indol-3-acetaldehído (IAAID), el ácido fenol acético (APA) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Kende y Zeevaart, 1997). La biosíntesis del AIA ocurre a partir del triptófano (TRP), a través de diversos intermediarios como el indol-3-acetamida (IAM), el ácido indol-3-pirúvico (IPA), el indol-3-acetaldoxima (IAOx) y la triptamina (TAM). La vía IPA involucra la remoción del grupo amino del triptófano y posteriormente su descarboxilación oxidativa por la enzima flavin monooxigenasa YUCCA (YUC) (Korasick *et al.*, 2013; Panoli *et al.*, 2015). La vía TAM está presente tanto en monocotiledóneas como dicotiledóneas y es similar a la vía IPA, difiriendo en que la primera reacción es una descarboxilación y después la desaminación del triptófano (Ljung *et al.*, 2005). Los niveles intracelulares del AIA también se regulan por la conjugación de esta hormona con azúcares, aminoácidos, ésteres y por su degradación mediante oxidación (oxAIA) (Fig. 10) (Ljung *et al.*, 2001).

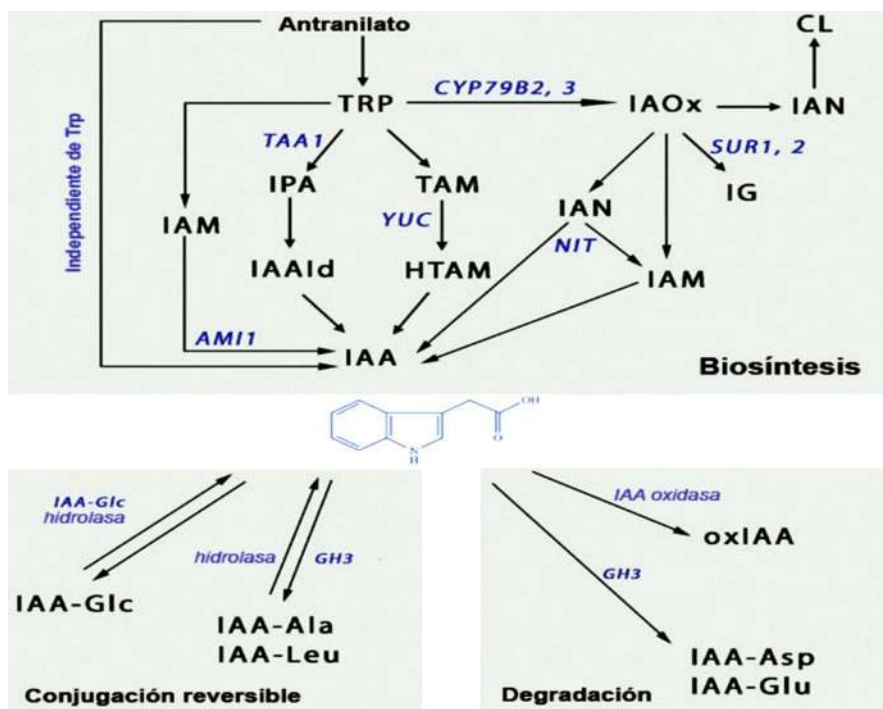


Figura 10. Homeostasis de las auxinas. El panel superior representa las vías de biosíntesis del AIA, incluyendo las rutas independientes y dependientes del TRP. Los paneles inferiores muestran la contribución de los complejos reversibles e irreversibles del AIA a la homeostasis de las auxinas (Tromas y Perrot-Rechenmann, 2010).

2.3.4 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, y se efectúa célula a célula con la ayuda de proteínas acarreadoras de influjo y de eflujo (Robert y Friml, 2009). El transporte polar de auxinas (TPA) está basado en la teoría quimiosmótica, la cual 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 aniónica (AIA⁻) a pH neutro. El pH en la pared celular es de 5.5, por lo cual alrededor del 15% del AIA está en forma protonada y puede difundir a través de la membrana. Mientras que en el citosol, cuyo pH es de 7, se favorece la estructura aniónica

del AIA⁻, por lo cual no puede ser transportado a través de la membrana hacia las células vecinas, así que su transporte requiere tanto de proteínas acarreadoras de influjo como de eflujo (Fig. 11) (Robert y Friml, 2009).

Los otros acarreadores de eflujo de las auxinas, son los llamados transportadores 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 en forma lateral (Cho y Cho, 2013). Dichos transportadores originalmente fueron identificados como moléculas que participan en los procesos de detoxificación (Martinoia *et al.*, 1993) y a partir de entonces se ha demostrado que están involucrados en las respuestas a los patógenos, la acumulación de fitatos en las semillas y en la interacción con el ácido abscísico. Algunas de estas proteínas co-localizan con los PINs 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 juegan una función importante 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).

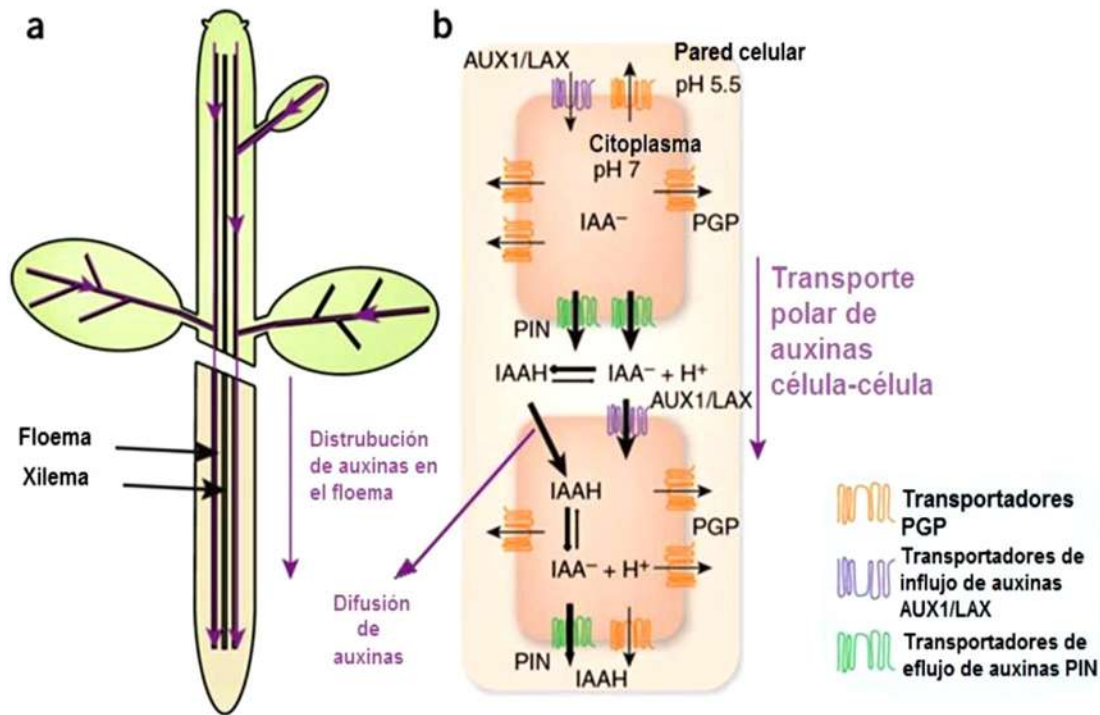


Figura 11. Transporte de las auxinas. **a)** Distribución de auxinas a través del floema desde los tejidos fuente de las hojas jóvenes y brotes florales hacia el ápice radicular. **b)** Transporte polar de auxinas. La auxina protonada AIAH puede difundir a través de la membrana plasmática, mientras que el IAA⁻ es transportado dentro de la célula por los acarreadores de influjo AUX1/LAX. En el citosol, el AIAH es disociado a AIA⁻ y por lo tanto queda atrapado dentro de la célula 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).

2.3.5 Vía de señalización de las auxinas

Las auxinas sintetizadas y transportadas a tejidos específicos activan una cascada de señalización que regula el desarrollo vegetal (Benjamins y Scheres, 2008). Cuando existe una concentración baja de auxinas dentro de la célula, los represores de la familia AUXIN/INDOLE ACETIC ACID (AUX/IAA) se unen a los factores de transcripción AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF), bloqueando la transcripción de genes de respuesta a auxinas. Durante este proceso los represores AUX/IAA reclutan a los co-represores TOPLESS (TPL) y TOPLESS RELATED (TPR), los cuales impiden la actividad transcripcional mediante el reclutamiento de desacetilasas de histonas (HDAC). Al elevarse

la cantidad de auxinas, estas moléculas son reconocidas por las proteínas de la familia TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEINS (TIR1/AFB), promoviendo su unión con el represor AUX/IAA. Posteriormente, TIR1 recluta a SKP1–Cul1–F-box (SCF), una ligasa tipo E3, que forma parte del complejo $SCF^{TIR1/AFB}$ el cual promueve la ubiquitinación del represor AUX/IAA para ser degradado en el proteosoma 26S. Una vez que la proteína AUX/IAA es degradada, los ARF son liberados y promueven así la transcripción de los genes de respuesta a auxinas (Fig. 12) (Wang y Estelle, 2014; Schaller *et al.*, 2015).

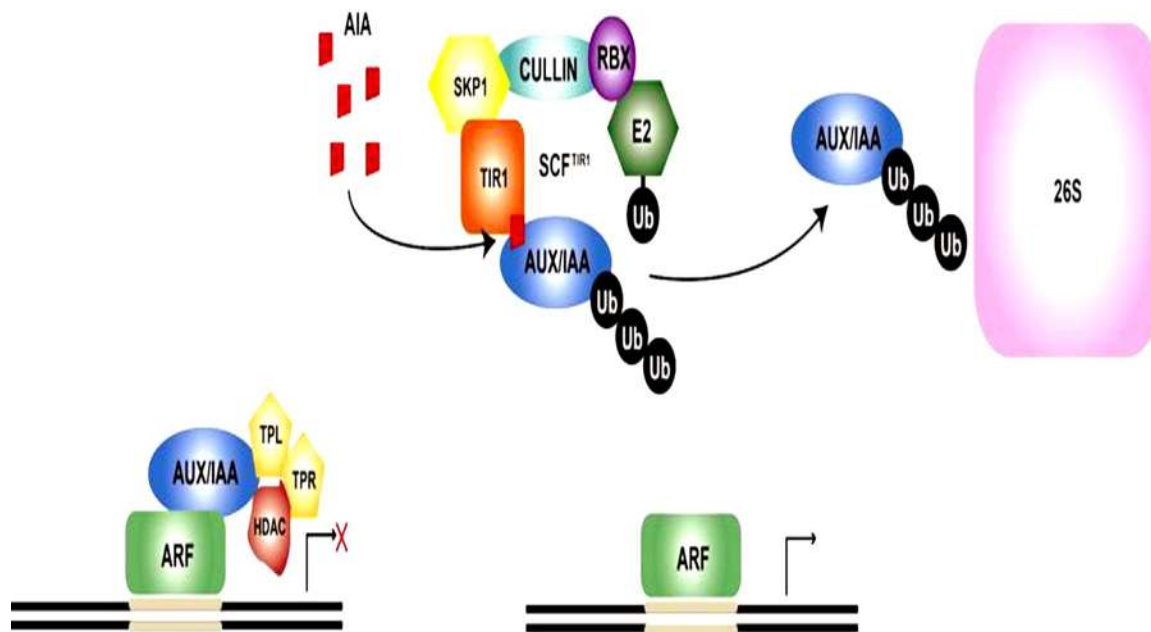


Figura 12. Vía de señalización de las auxinas. Cuando el nivel de auxinas es bajo, el represor AUX/IAA con la ayuda de las proteínas TPL, TPR y HDAC mantiene reprimida la función de los ARF evitando la transcripción de los genes de respuesta a auxinas. Al aumentar el nivel de auxinas se favorece la formación del complejo SCF^{TIR1} el cual ubiquitina y degrada al represor AUX/IAA en el proteosoma 26S, liberando así a los ARF que permiten la transcripción de los genes de respuesta a auxinas (Wang *et al.* 2014).

2.4 Las citocininas (CK)

Las citocininas son moléculas derivadas de la adenina que se sintetizan en los tallos, raíces, hojas, flores, frutos o semillas, aunque en mayor cantidad en las raíces. Las CK están implicadas en el control de la actividad de los meristemos, la diferenciación vascular, la biogénesis de cloroplastos y las respuestas a estreses bióticos y abióticos (Kieber y Haberer, 2002; Müller y Sheen, 2006). Las CK sintetizadas en la raíz se transportan vía xilema hacia las hojas, para luego ser exportadas por los transportadores de entrada PUP/ENTs (PURINE PERMEASES/EQUILIBRATIVE NUCLEOSIDE TRANSPORTERS) y de salida ABCG14 (ATP-BINDING CASSETTE) vía floema hacia otros órganos (Srivastava *et al.*, 2002). La percepción y señalización de las CK se lleva a cabo a través de una cascada de fosforilación, que incluye al receptor de membrana histidina cinasa de *Arabidopsis* (AHK), a las proteínas histidina fosfotransferasa (AHP) y a los factores de transcripción de respuesta a citocininas (ARR). Las CK se unen al receptor AHK, el cual se autofosforila y posteriormente transfiere un grupo fosfato a las proteínas AHP. Posteriormente, el fosfato es translocado al factor de respuesta a citocinina ARR tipo B activando la transcripción de los genes de respuesta a las CK (Fig. 13) (Bishopp *et al.*, 2006; Müller y Sheen, 2006).

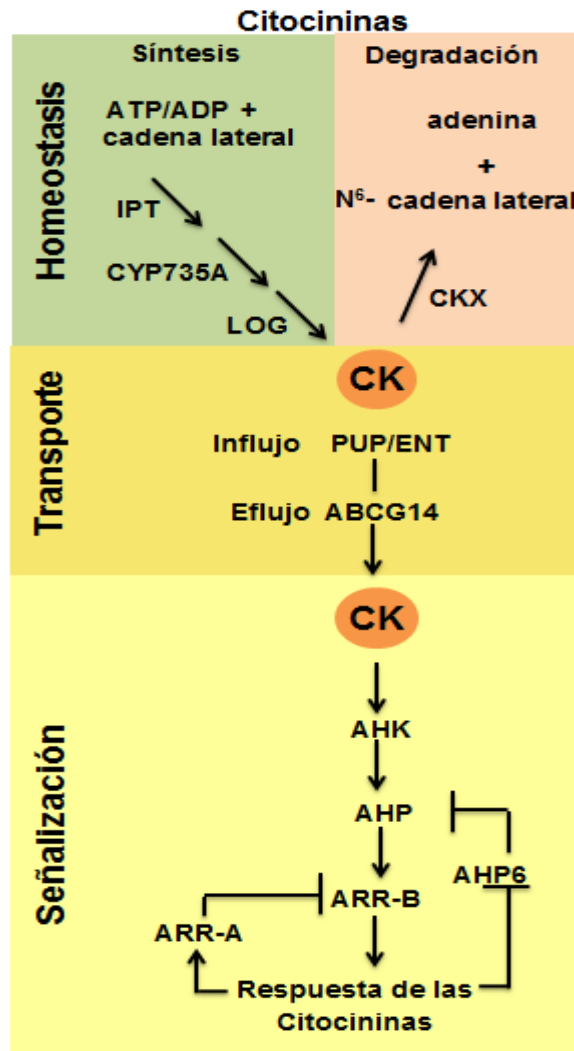


Figura 13. Vía de respuesta a las citocininas. La homeostasis de las CK en la célula comprende la síntesis a partir de adenina y el catabolismo mediante la separación de la cadena isopenteniladenina. Las CK son transportadas de la punta de la raíz hacia diferentes órganos de la planta por transportadores de influjos PUP/ENT y de eflujos ABCG14. Los receptores de las CK, histidina cinasa de dos componentes AHK, acoplados a la membrana del retículo endoplásmico tras la unión de la hormona se autofosforilan y transmiten la señal hasta activar a los reguladores positivos tipo ARR-B y/o a los negativos tipo ARR-A de la vía (Schaller *et al.*, 2015).

2.4.1 El cruce de señales entre las auxinas y las citocininas

Las auxinas y las CK regulan en forma antagónica los procesos del crecimiento de la raíz primaria (descritos en el apartado 2.2.1, Fig. 4) y el desarrollo de las raíces laterales de la planta. Respecto a las funciones de las CK sobre el desarrollo de las RL, éstas a través de los factores ARR1 y ARR5 lo inhiben. Mientras que las auxinas lo promueven al degradar a los represores SLR/IAA14 y SHY2/IAA3 y liberar a los factores ARF7 y ARF19, los cuales a su vez estimulan la transcripción de los factores LBD16 y LBD29 involucrados en el desarrollo de las RL (Fig. 14) (Moubayidin *et al.*, 2009; Lavenus *et al.*, 2013).

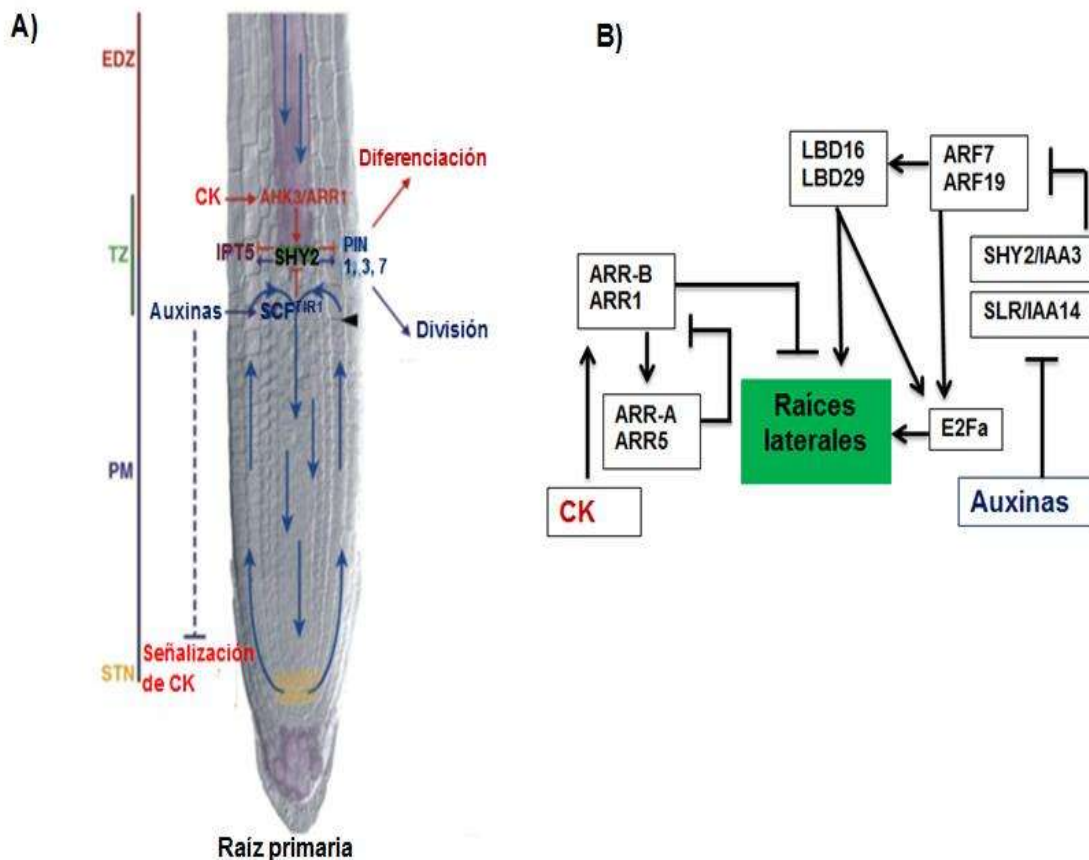


Figura 14. El antagonismo entre las auxinas y las CK sobre el crecimiento de la raíz primaria y el desarrollo de las raíces laterales de *Arabidopsis*. **A)** antagonismo de las auxinas y las CK sobre el crecimiento de la raíz primaria. **B)** antagonismo de las auxinas y las CK sobre el desarrollo de las RL (Moubayidin *et al.*, 2009; Lavenus *et al.*, 2013).

2.5 El etileno

El etileno modula la germinación de la semilla, la morfología de la plántula, la maduración del fruto, la elongación de pelos radiculares, el envejecimiento de las hojas, la defensa y la tolerancia a factores bióticos y abióticos (Bleecker y Kende, 2000). Dichos procesos están coordinados mediante la unión de la fitohormona a sus receptores en forma de homodímeros de los cuales se conocen cinco tipos, incluyendo a ETHYLENE RESPONSE 1 (ETR1), ETR2, ETHYLENE RESPONSE SENSOR 1 (ERS1), ERS2 y ETHYLENE INSENSITIVE 4 (EIN4) (Zhao y Guo, 2011). En ausencia de etileno, los receptores mantienen a la cinasa CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1 (CTR1) en un estado activo, lo cual reprime las respuestas celulares dependientes de esta fitohormona (Clark *et al.*, 1998). En presencia de etileno, el receptor (Hua y Meyerowitz, 1998) ocasiona que CTR1 se inactive, por lo que es incapaz de fosforilar a ETHYLENE INSENSITIVE 2 (EIN2), permitiendo entonces el procesamiento proteolítico y la translocación nuclear de este último (Ju *et al.*, 2012; Qiao *et al.*, 2012). Como resultado, EIN2 activa una cascada transcripcional que involucra a los factores de transcripción ETHYLENE INSENSITIVE 3/ EIN3-like 1 (EIN3/EIL1) (Fig. 15) (Chao *et al.*, 1997; Solano *et al.*, 1998).

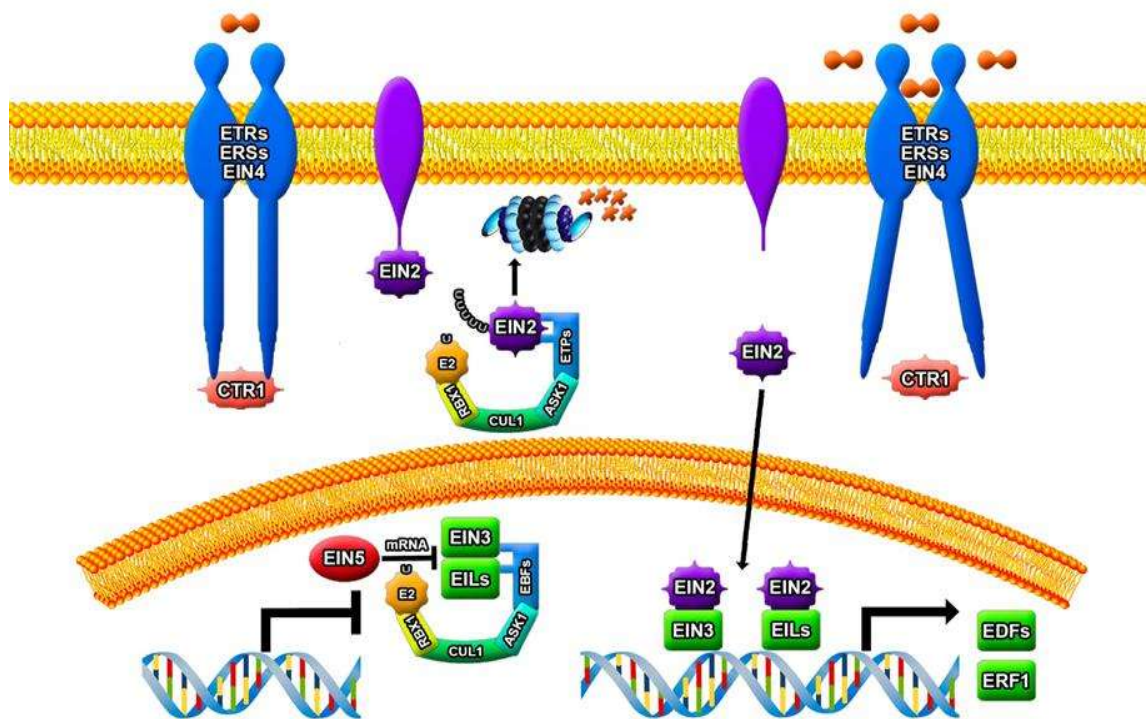


Figura 15. La ruta de señalización del etileno. En ausencia de etileno, la familia de receptores (ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 y EIN4) activan al regulador negativo CTR1, el cual inactiva a EIN2, permitiendo que mediante su marcaje con ubiquitina (Ub) dependiente del complejo SCF^{EBF1/2}, los factores de transcripción (EIN3 y EIL1) sean degradados por el proteosoma. En presencia de etileno, los receptores inactivan a CTR1 por lo que EIN2 bloquea la degradación de los factores EIN3 y EIL1 y entonces estos últimos estimulan la transcripción de los genes de respuestas a etileno (Binder *et al.*, 2007).

2.5.1 Interacción auxinas-etileno

La síntesis de etileno se incrementa en las plantas ante un ataque de patógenos asociándose a reacciones de defensa, mientras que en respuestas a estreses abióticos inhibe el crecimiento de los órganos de las plantas (Achard *et al.*, 2006). El etileno a dosis bajas estimula la biosíntesis de las auxinas, lo que promueve la iniciación del desarrollo de las raíces laterales a través de la vía transcripcional de las auxinas. Mientras que a dosis altas, ocasionadas por estreses externos y respuestas a patógenos, el etileno inhibe el inicio del desarrollo de las raíces laterales (Fig.16) (Janelle *et al.*, 2013).

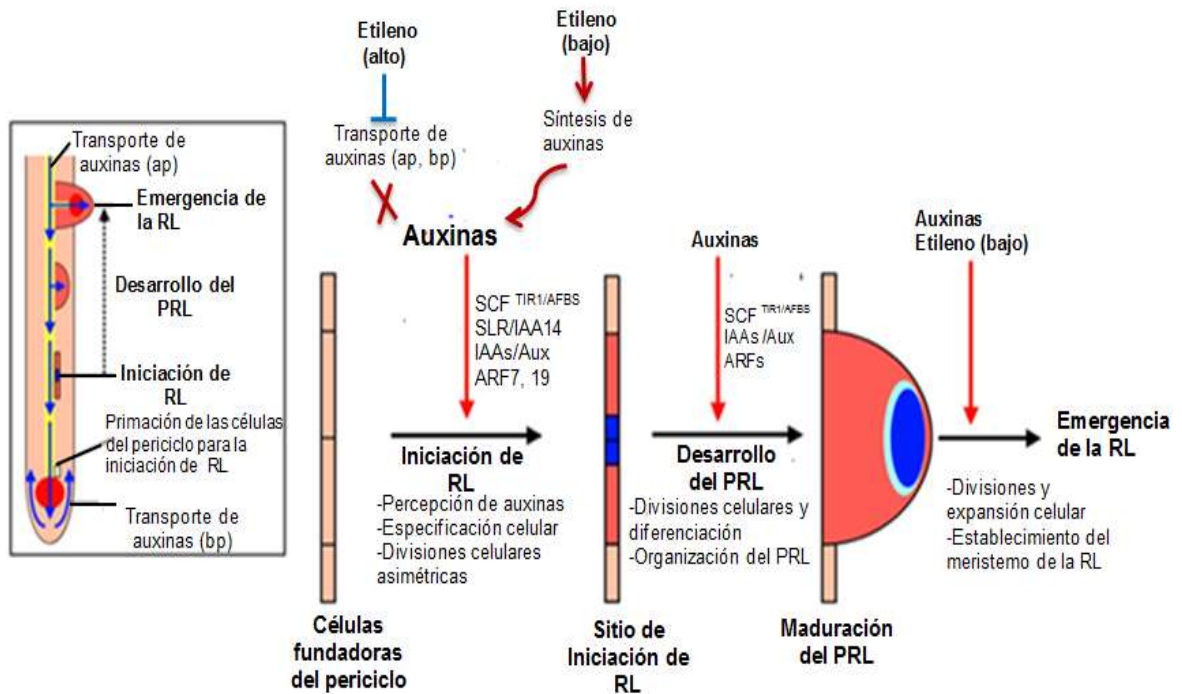


Figura 16. Control hormonal y genético de la formación de las raíces laterales en *Arabidopsis*.

La formación de las RL es un proceso que consiste de tres etapas: iniciación, desarrollo y emergencia. La iniciación está regulada positivamente por las auxinas y negativamente por las CK y por altas concentraciones de etileno. El transporte polar de auxinas en ambas direcciones: acropetal (ap) y basipetal (bp) es necesario para la iniciación de las RL y el establecimiento de un gradiente de auxinas para organizar el PRL. Las CK inhiben la formación del máximo de auxinas, al alterar la expresión de los transportadores PIN evitando así la iniciación de las RL. Altas concentraciones de etileno inhiben la iniciación de las RL al mejorar el transporte acropetal y basipetal de las auxinas, mientras que bajas concentraciones de etileno promueven la iniciación de las RL al aumentar la síntesis de las auxinas (Janelle *et al.*, 2013).

2.6. La rizosfera: Un entorno dinámico con actividad metabólica y microbiológica

El sistema radicular influye sobre las poblaciones microbianas, particularmente abundantes en la región conocida como rizosfera, término que se refiere a la porción del suelo que rodea a las raíces y que está habitado por poblaciones de microorganismos influenciados por los compuestos que producen las plantas (McNear, 2013). Por otra parte, 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, citocininas y giberelinas (Gutiérrez-Mañero *et al.*, 2011). Los mecanismos indirectos involucran la competencia con otros microorganismos fitopatógenos mediante la producción de antibióticos que inhiben el crecimiento de otros microorganismos (Whipps, 2001; Schwartz *et al.*, 2013; Hamedi y Mohammadipanah, 2014; Chowdhury *et al.*, 2015) la producción de sideróforos (compuestos quelantes del hierro secretado por la bacteria) (Wang y Estelle, 2014) o la inducción de la resistencia sistémica en las plantas (resistencia conferida en respuesta al ataque del patógeno) (Annapurna *et al.*, 2013; Rangel de Souza *et al.*, 2015).

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 rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR, de sus siglas en inglés) 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. 17). La bacteria ha sido aislada de la rizosfera de las 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 presentar flagelos polares que le permiten moverse hacia la raíz de la planta para utilizar sus exudados como fuente de carbono y a su vez beneficiar el crecimiento vegetal a través de diferentes mecanismos que incluyen la secreción de

fitohormonas, la solubilización de macro y micro nutrientes como el fósforo, hierro y la fijación del nitrógeno entre otros factores (Spaepen *et al.*, 2009). 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 en un 9 % la producción de semillas y en un 18% el peso seco de la planta 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).

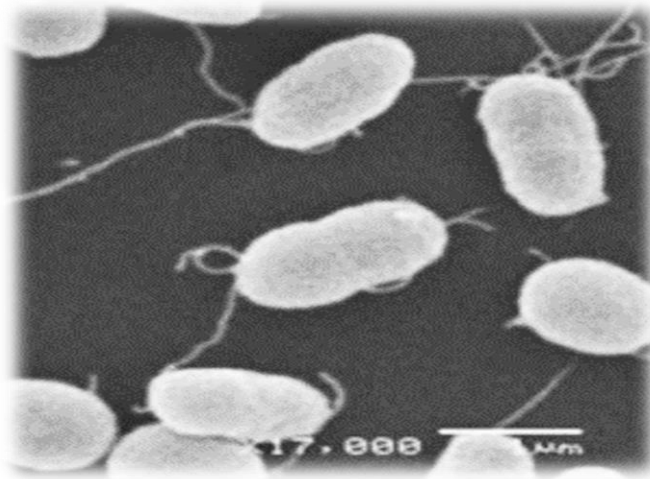


Figura 17. *Azospirillum brasilense*. Esta bacteria que pertenece al grupo de las PGPR presenta un flagelo polar que le permite moverse hacia las raíces de la planta. Entre los fitorreguladores que sintetiza se encuentran el AIA, CK, ABA, GA y el etileno (Burdman *et al.*, 1998).

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 de preferencia las zonas de elongación de la raíz y de pelos radiculares. El efecto general de *Azospirillum* al igual que otras PGPR en las plantas es una disminución de la longitud de la raíz primaria, un aumento del número de raíces laterales y mayor crecimiento del follaje (Fig. 18) (Verbon y Liberman, 2016).

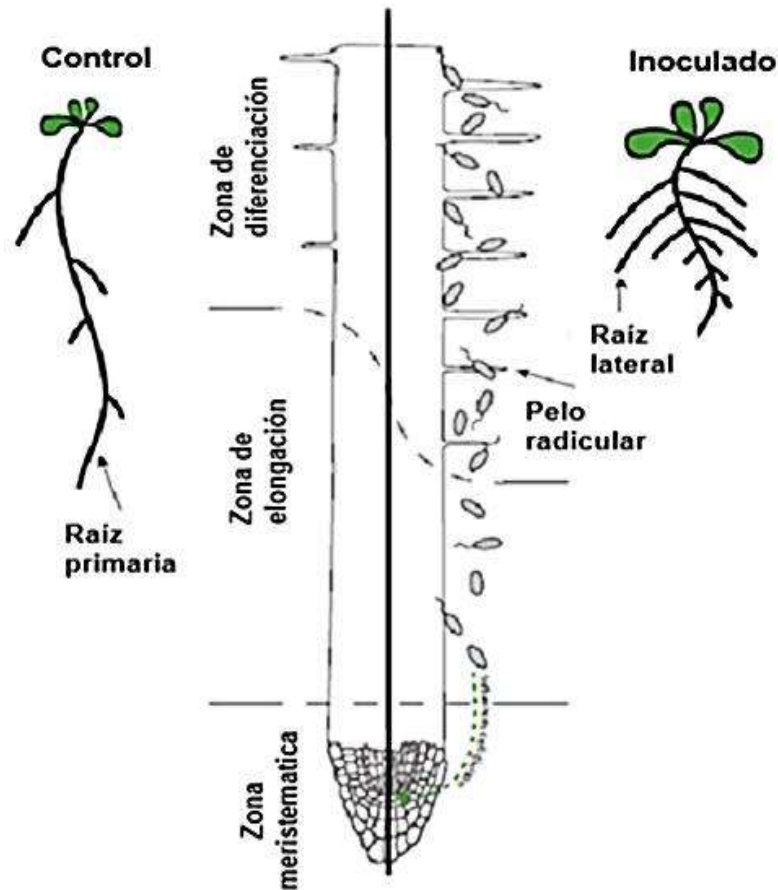


Figura 18. Las bacterias influyen sobre la fisiología vegetal y el desarrollo de la arquitectura radicular de las plantas. Las PGPR aumentan el crecimiento de la parte aérea de la planta, disminuyen la longitud de la raíz primaria e incrementan el número de las raíces laterales cuando se aplican a las raíces de la planta (Verbon y Liberman, 2016).

2.8 Interacción planta–*Azospirillum*

Las raíces excretan exudados a la rizosfera entre los que se encuentran: i) ácidos orgánicos que disminuyen el pH y así 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, las CK, el ácido absicico (ABA), el ácido giberélico (GA) y el etileno (Et). El AIA funciona como molécula señal para que *Azospirillum* a su vez la sintetice, libere y la planta la absorba, lo que resulta en un incremento del número raíces laterales que facilitan la adquisición de agua y nutrientes lo que permite un aumento en el crecimiento del follaje y del rendimiento de semillas (Fig. 19) (Lambrecht *et al.*, 2000).

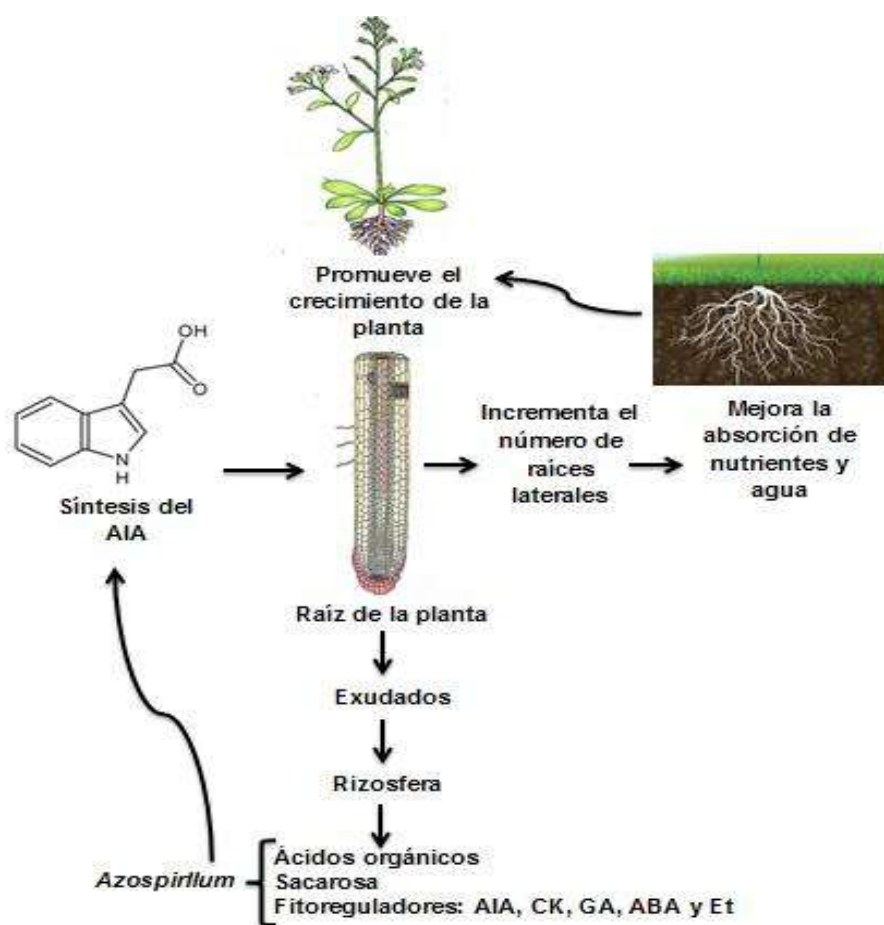


Figura 19. Efecto de la interacción planta-PGPR. Las plantas producen exudados radiculares que aportan nutrientes a la bacteria. Algunas PGPR estimulan el crecimiento vegetal por un mecanismo directo mediante la producción de fitohormonas como el AIA (Lambrecht *et al.*, 2000).

2.8.1. 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 cepa mutante no alteró la arquitectura radicular de la planta. Estos resultados les permitieron a los autores sugerir que las auxinas producidas por la bacteria podrían estar involucradas en los cambios morfológicos de la arquitectura radicular de *Arabidopsis* (Fig. 20) (Spaepen *et al.*, 2014).

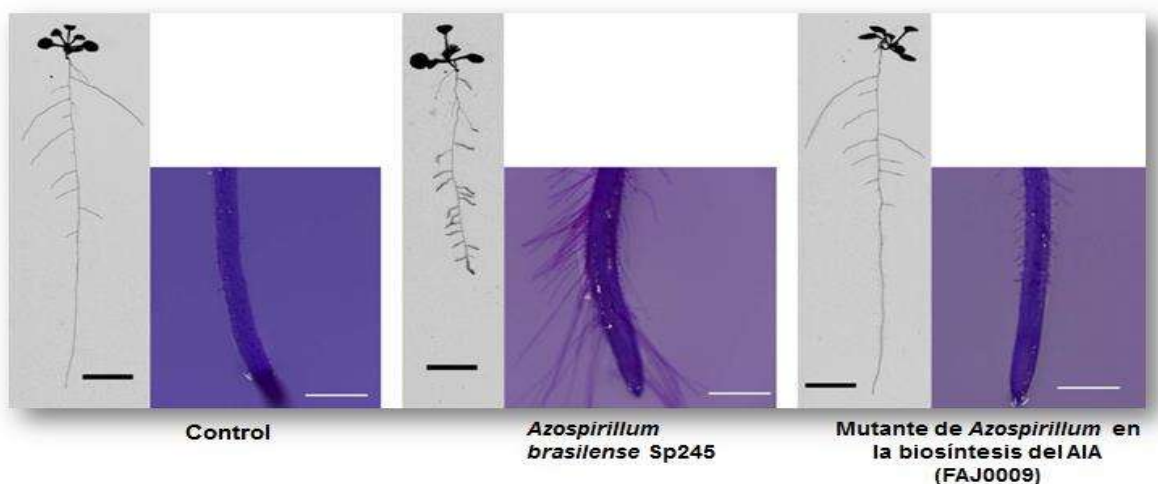


Figura 20. Efecto de la inoculación de *Arabidopsis* con *Azospirillum brasilense* silvestre y la mutante FAJ009. Cambios morfológicos sobre la arquitectura radicular de *Arabidopsis* inoculada con una cepa silvestre de *Azospirillum brasilense* Sp245 y con una mutante en la biosíntesis de las auxinas (FAJ009) comparadas con el control. La cepa silvestre disminuyó la longitud de la raíz primaria e incrementó el desarrollo de pelos radiculares y de raíces laterales, mientras que la raíz de la planta inoculada con la cepa mutante no mostró ningún cambio respecto al control (Spaepen *et al.*, 2014).

Spaepen *et al.* (2014) determinaron la expresión génica mediante un análisis de microarreglos de las raíces de *Arabidopsis* expuestas durante tres y siete días a las cepas de *Azospirillum* silvestre y a la mutante en la biosíntesis de las auxinas (FAJ0009). El transcriptoma sufrió cambios muy extensos después de la inoculación de la bacteria y estos fueron más pronunciados a los siete días de interacción. La cepa silvestre indujo cambios en la expresión de genes relacionados a la defensa y a la síntesis de componentes de la pared celular. Mientras que la inoculación con la cepa mutante no provocó estos cambios transcripcionales en la misma extensión.

3. JUSTIFICACIÓN

Azospirillum brasilense Sp245 incrementa el crecimiento y rendimiento de semillas en cultivos de importancia agrícola y este efecto se ha atribuido a las auxinas que produce la bacteria. Para investigar el mecanismo molecular involucrado en la interacción *Azospirillum*-planta, en la presente investigación se utilizó la planta modelo *Arabidopsis thaliana* como hospedero de la bacteria.

4. HIPÓTESIS

Azospirillum brasilense Sp245 altera la arquitectura radicular de *Arabidopsis thaliana* a través de la vía de respuesta a las auxinas.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar los elementos de la vía de respuesta a las auxinas que participan en los cambios de la arquitectura radicular de *Arabidopsis* durante su interacción con *Azospirillum brasilense* Sp245.

5.2 Objetivos específicos

1. Evaluar los cambios en la arquitectura radicular de plántulas de *A. thaliana* expuestas a diferentes concentraciones de inóculo de *A. brasilense* Sp245.
2. Analizar el efecto de *Azospirillum* sobre la arquitectura radicular y el desarrollo de los primordios de las raíces laterales de *Arabidopsis* a diferentes tiempos (días) de exposición a la bacteria.
3. Determinar el efecto de *Azospirillum* sobre el nivel de las auxinas, la división y la elongación celular de las raíces de *Arabidopsis* a diferentes días de exposición a la bacteria.
4. Analizar los elementos de la red de respuesta a las auxinas que participan en el efecto de *Azospirillum* sobre el desarrollo radicular de *Arabidopsis*.
5. Analizar algunos elementos adicionales a la red de respuesta a las auxinas involucrados en el efecto de *Azospirillum* sobre la arquitectura radicular de *Arabidopsis*.
6. Evaluar el efecto de *Azospirillum* sobre la arquitectura radicular de las plántulas de *Arabidopsis* en presencia del NPA, inhibidor del transporte polar de auxinas.
7. Evaluar la participación de las citocininas y el etileno sobre el efecto de *Azospirillum* sobre la arquitectura radicular de *Arabidopsis*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material vegetal

En este estudio se utilizaron semillas silvestres de *A. thaliana* ecotipo Col-0 y de las siguientes mutantes en el fondo genético Col-0: *yucca3 yucca6* (Cho y Cosgrove, 2002); *aux1-7* (Pickett *et al.*, 1990); *pin1* (Benková *et al.*, 2003); *pin2* (Xu *et al.*, 2005); *pin3* (Friml *et al.*, 2002); *tir1afb2afb3* (Parry *et al.*, 2009); *axr1-3* (Lincoln *et al.*, 1990); *slr1* (Fukaki *et al.*, 2001), *arf7 arf 19* (Wilmoth *et al.*, 2005); *axr4-1* (Hobbie y Estelle, 1995); *ben2* (Tanaka *et al.*, 2013); *pgp1* (Dharmasiri *et al.*, 2005); *pgp4* (Galinha *et al.*, 2007) y *pgp19* (Noh *et al.*, 2003). También se emplearon semillas de las mutantes *ahk2-2 ahk3-3* (Vadassery *et al.*, 2008); *ahk2-2* (To *et al.*, 2007), *etr1* (Lewis *et al.*, 2011), *ein2* (Ivanchenko *et al.*, 2008), *ein3* (Potuschak *et al.*, 2003) y de las líneas reporteras *DR5::uidA* (Ulmasov *et al.*, 1997), *CycB1::uidA* (Colón-Carmona *et al.*, 1999) y *Exp7::uidA* (Cho y Cosgrove, 2002).

6.2 Métodos

6.2.1 Desinfección, siembra e incubación de las semillas

Las semillas de las diferentes líneas de *Arabidopsis* se contaron, colocaron en un tubo Eppendorf y se desinfectaron añadiendo un mL de agua tridestilada estéril por 10 min con agitación ocasional. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se adicionó un mL de etanol absoluto agitando constantemente durante un minuto. Después de eliminar el etanol, se agregó un mL de solución desinfectante (Cloro al 5% y Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) al 1%) y se agitó constante y vigorosamente por 5 min. Se eliminó la solución anterior y las semillas se lavaron siete veces con un mL de agua tridestilada estéril. Finalmente, las semillas se incubaron en un mL de agua a 4°C por 48 h. Posteriormente, las semillas fueron sembradas en cajas de Petri que contenían el medio de cultivo 0.2X MS, 0.5% de sacarosa, 0.8g/L de fitoagar y 200 µL/L de una solución de vitaminas y se incubaron en posición vertical en una cámara de crecimiento con fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad a 22°C.

6.2.2 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 correspondiente 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 1 mg/mL, piridoxina 5 mg/mL y ácido nicotínico 5 mg/mL).

6.2.3 Preparación del medio de cultivo inoculado con *Azospirillum Sp245*

La bacteria se mantuvo en medio de cultivo LB-Tetraciclina (peptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L, MgSO₄ 0.186 g/L, CaCl₂ 0.2775 g/L, agar 1g/L y tetraciclina 10 µg/mL) a 4°C. El cultivo bacterial fue reseñado cada 10 días en caja de 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 reseñó 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 partir de la relación 0.9 Abs equivale a 1X10⁸ UFC/mL se determinó la concentración de la solución stock. Después, se calculó el volumen requerido de esta última solución para obtener una concentración de 2.5X10⁵ UFC/mL de *Azospirillum*, 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.

6.2.4 Transferencia de las plántulas a medios de cultivo suplementados con *Azospirillum brasilense* Sp245

Las plántulas de 5 días de edad (dde) se transfirieron a las cajas Petri que contenían el medio 0.2X de MS sin la bacteria (control) e inoculado con 2.5×10^5 UFC/mL de *Azospirillum*. Las cajas sembradas se incubaron durante 1, 3, 6 y 9 días más en la cámara de crecimiento en las condiciones antes mencionadas.

6.2.5 Transferencia de las plántulas a medios de cultivo suplementados con NPA (ácido N-1- naftitalámico) y *Azospirillum brasilense* Sp245

Las plántulas Wt de *Arabidopsis* de 5 dde se transfirieron a las cajas Petri que contenían el medio 0.2X MS sin la bacteria (control) e inoculado con 2.5×10^5 UFC/mL de *Azospirillum* y estos mismos medios adicionados con NPA (1 μ M). El material se incubó durante 3, 6 y 9 días más en la cámara de crecimiento en las condiciones antes mencionadas.

6.2.6 Actividad histoquímica *uidA*

Las plántulas transgénicas *DR5::uidA*, *CycB1::uidA* y *EXP7::uidA* de *Arabidopsis* de 5 dde fueron expuestas a la bacteria por 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 9 d, se colocaron en cajas para microtítulo donde se incubaron con una disolución de X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D glucurónido) al 0.1% en un amortiguador de fosfatos (NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 0.1 M pH 7) con $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ y $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 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 0.24 N, 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 y se añadieron disoluciones con diferentes concentraciones de etanol (40, 20 y 10 %) y 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 y se observaron al

microscopio con el objetivo de 10X y se tomaron las fotografías de la raíz primaria y de las raíces laterales.

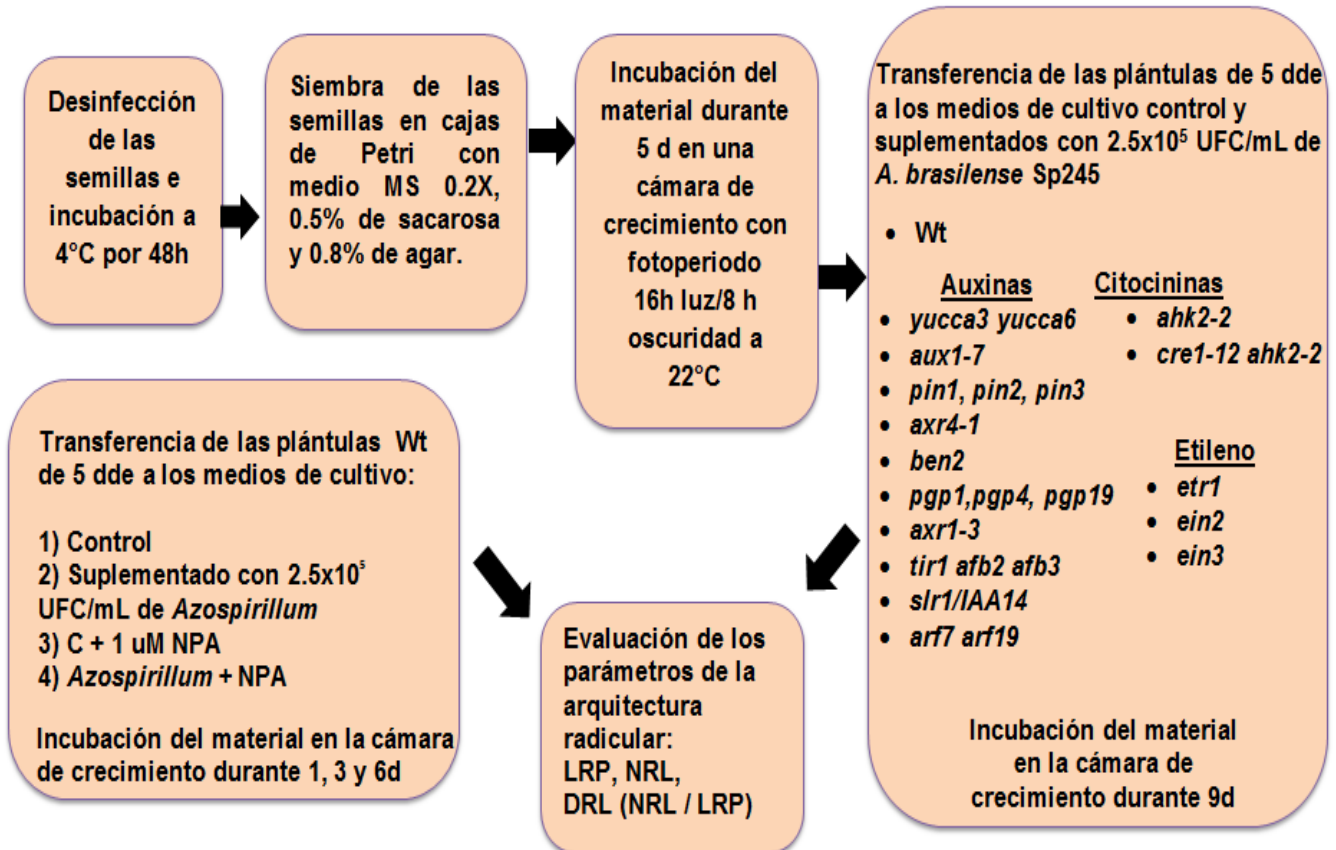
6.2.7 Evaluación de la arquitectura radicular de las plántulas

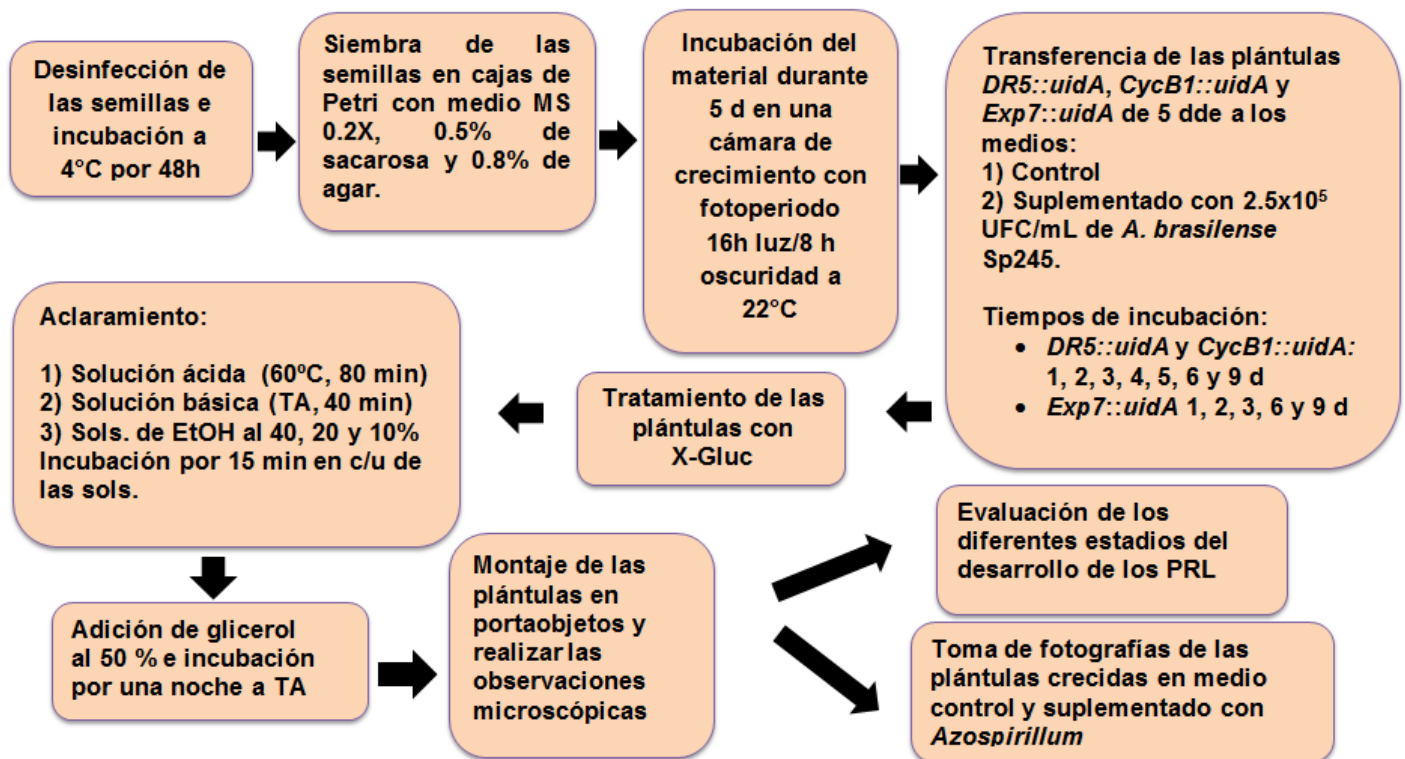
En plántulas de 14 dde (con 9 días de exposición a la bacteria) se determinaron los parámetros de la arquitectura radicular: longitud de la raíz primaria (LRP), número de raíces laterales (NRL) y la densidad de raíces laterales (DRL). La LRP se midió con una regla (cm), el NRL se obtuvo contando las raíces que emergen de la raíz primaria bajo un estereomicroscopio (Iroscope ES-24 Leica) con un objetivo 4X y la DRL se obtuvo con el cociente del NRL entre la LRP.

6.2.8 Análisis estadístico

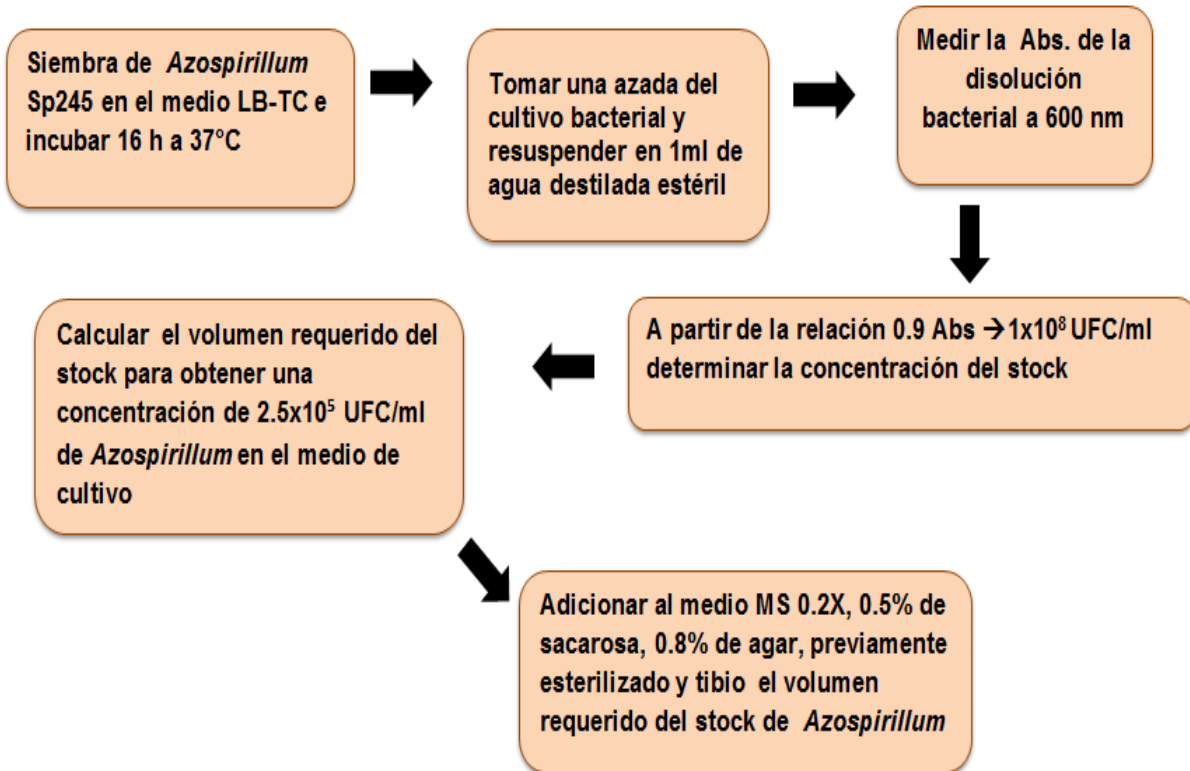
Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces de manera independiente tomando como muestra representativa 25 plántulas por tratamiento. A los datos obtenidos se les aplicó un análisis estadístico, con el programa Statistica 8.0 y los datos se analizaron por univarianza con la prueba de post hoc Tukey con una diferencia significativa de ($p < 0.05$).

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL





Preparación del medio suplementado con *Azospirillum brasilense* Sp245



8. RESULTADOS

8.1 Efecto de diferentes concentraciones de *Azospirillum brasilense* Sp245 sobre la arquitectura radicular de *Arabidopsis*

Como ha sido reportado que *Azospirillum* altera la arquitectura radicular de *Arabidopsis*, en el presente estudio se analizó si este efecto podría ser dependiente de la concentración de la bacteria. Para esto, plántulas de *Arabidopsis* de 5 días de edad (dde) germinadas y crecidas en el medio de cultivo Murashige-Skoog 0.2X MS, 0.5% de sacarosa y 0.8% de fitoagar y en fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad a 22°C se transfirieron al medio de cultivo antes mencionado sin y suplementado con 2.5×10^4 , 2.5×10^5 y 2.5×10^6 UFC/mL de *Azospirillum*. El material se incubó 9 días en las condiciones antes mencionadas. En la figura 21 se puede observar que en las plántulas de 14 dde disminuyó la longitud de la raíz primaria (LRP) alrededor del 70% y el número de raíces laterales (NRL) incrementó en promedio un 80% en las tres concentraciones ensayadas. Estos resultados mostraron que independientemente de la concentración de *Azospirillum*, la bacteria disminuye la LRP e incrementa el NRL en *Arabidopsis* en la misma proporción.

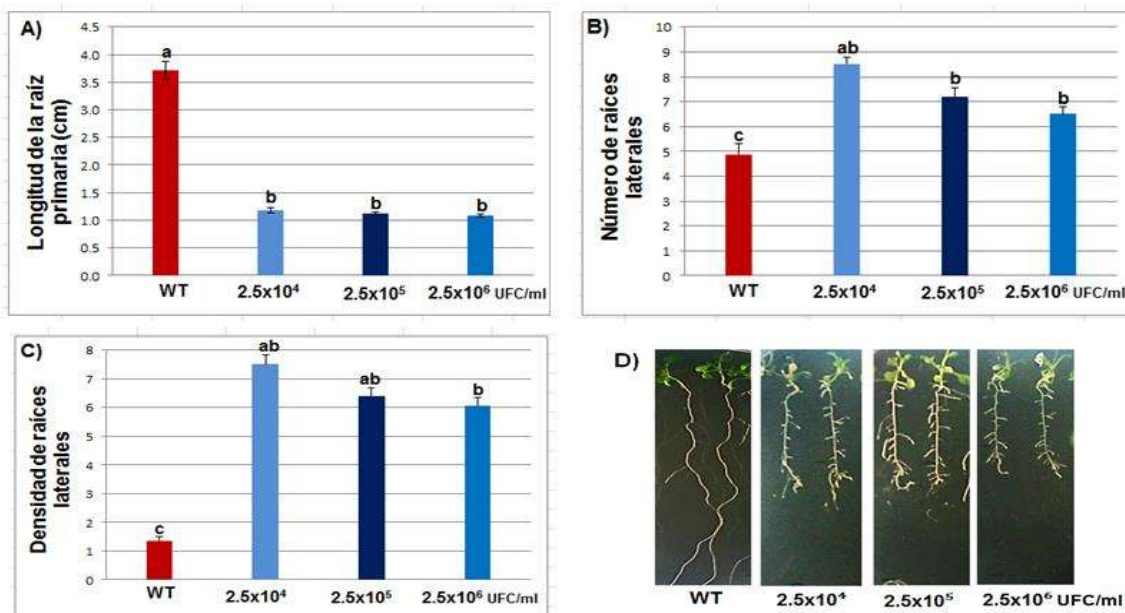


Figura 21. Efecto de diferentes concentraciones de *A. brasilense* Sp245 sobre el desarrollo radicular de *Arabidopsis*. Las plántulas Col-0 de *Arabidopsis* de 5 dde fueron transferidas a medios suplementados con 2.5×10^4 , 2.5×10^5 y 2.5×10^6 UFC/mL de *Azospirillum* e incubadas 9 días más. **A)** Longitud de la raíz primaria. **B)** Número de raíces laterales. **C)** Densidad de raíces laterales. **D)** Fotografías representativas de las plántulas en medio control e inoculado con *Azospirillum* a diferentes concentraciones. Los valores representan el promedio de 25 plántulas \pm error estándar. Las letras indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con una prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Los experimentos fueron repetidos tres veces con resultados similares.

Como el efecto de *Azospirillum* sobre el desarrollo de la arquitectura radicular de *Arabidopsis thaliana* fue independiente de la concentración de la bacteria, se decidió utilizar en todos los experimentos posteriores la concentración de 2.5×10^5 UFC/mL de *Azospirillum* porque a esta concentración las RL fueron más largas. Plántulas de *Arabidopsis* de 5 dde se transfirieron a medio de cultivo sin y suplementado con 2.5×10^5 UFC/mL de *Azospirillum* y se incubaron 9 días más a las condiciones antes mencionadas. Las plántulas de 14 dde mostraron una disminución en la LRP del 68% y un aumento del 103% y 593% en el NRL y la DRL respectivamente (Fig. 22).

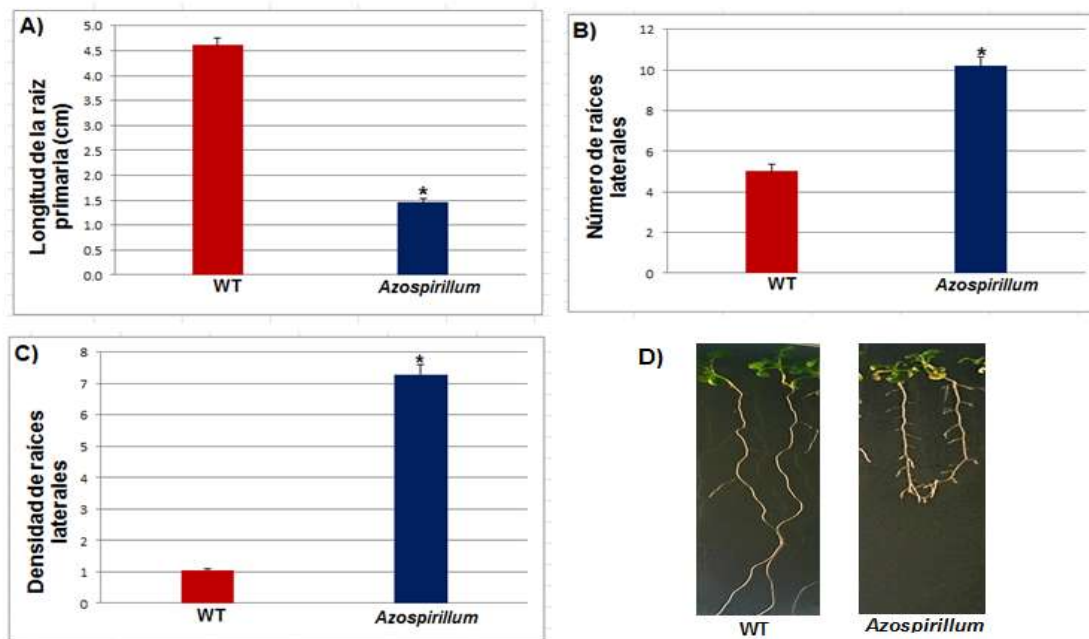


Figura 22. Efecto de *Azospirillum brasilense* Sp245 sobre la arquitectura radicular de *Arabidopsis*. A) Longitud de la raíz primaria. B) Número de raíces laterales. C) Densidad de raíces laterales y D) Fotografías representativas de las plántulas Wt en el medio control e inoculado con 2.5×10^5 UFC/mL de *Azospirillum*. Las barras truncadas representan el error estándar con una $n=25$ plántulas y los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con una prueba de t-Student ($P \leq 0.05$). Los experimentos fueron repetidos tres veces con resultados similares.

En base a que *Azospirillum* disminuye la LRP y aumenta el NRL en plántulas de *Arabidopsis* de 14 dde con 9 días de exposición a la bacteria, se decidió analizar los cambios en la arquitectura radicular de *Arabidopsis* a diferentes tiempos de exposición a *Azospirillum*, para lo cual plántulas Wt de 5 dde se transfirieron a medios de cultivo sin y suplementados con 2.5×10^5 UFC/mL de *A. brasilense*. El material se incubó durante 1, 3 y 6 días más en una cámara de crecimiento en las condiciones antes mencionadas. En la figura 23 se puede observar que en las plántulas expuestas a *Azospirillum*, la LRP alcanzada en el primer día de exposición se mantiene, en tanto que el NRL incrementa notoriamente a los tres y seis días de exposición de la planta a la bacteria.

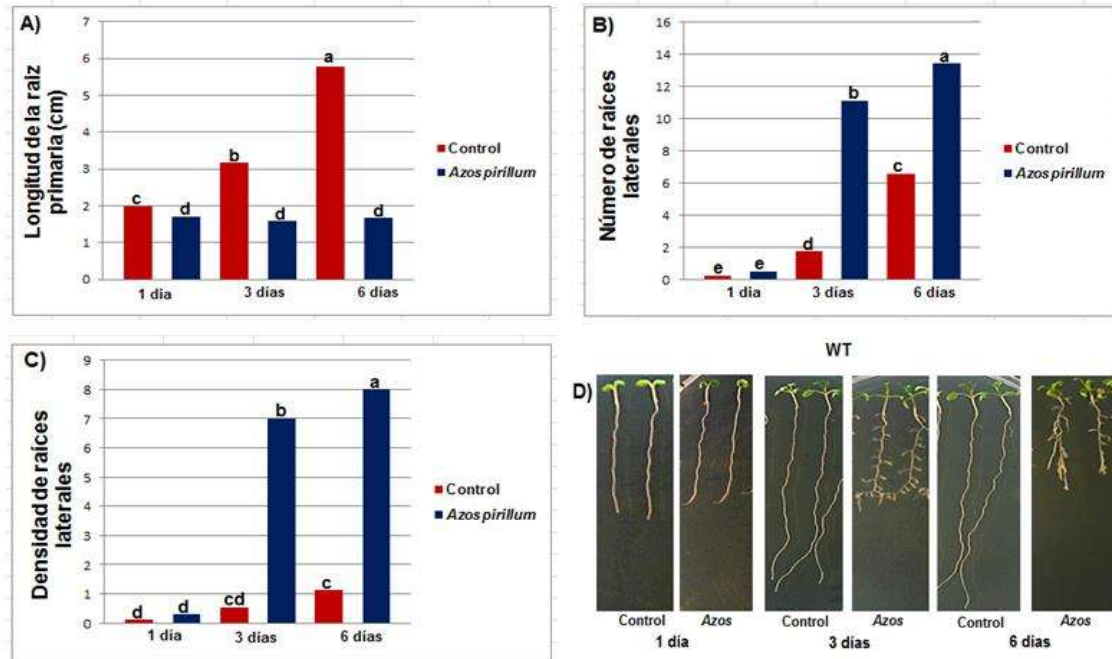


Figura 23. Efecto de diferentes tiempos de exposición a *Azospirillum* sobre la arquitectura radicular de *A. thaliana*. A) Longitud de la raíz primaria. B) Número de raíces laterales. C) Densidad de raíces laterales y D) Fotografías representativas de las plántulas Wt de 5 dde crecidas en el medio control y en el medio inoculado con 2.5×10^5 UFC/mL de *Azospirillum* por 1, 3 y 6 días más. Los valores representan el promedio de 25 plántulas \pm error estándar. Las letras indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Los experimentos fueron repetidos tres veces con resultados similares.

8.2 Efecto de *Azospirillum brasilense* Sp245 sobre el desarrollo de los primordios de las raíces laterales de *Arabidopsis*

Debido a que *Azospirillum* incrementa el NRL en *Arabidopsis* desde los primeros días de exposición a la bacteria, se decidió analizar en qué forma *Azospirillum* afecta el desarrollo de las estructuras que darán lugar a las RL, es decir, a los primordios de las raíces laterales (PRL) de las plántulas expuestas a la bacteria a diferentes tiempos. Plántulas *DR5::uidA* de 5 dde se transfirieron a medios sin y suplementados con 2.5×10^5 UFC/mL de *Azospirillum* donde se incubaron durante 1, 3, 6 y 9 días más. Las plántulas fueron tratadas con X-Gluc y posteriormente se sometieron a un proceso de aclaramiento, se montaron en portaobjetos

y se contaron los PRL en diferentes estadios de desarrollo observándolos en un microscopio con un aumento de 40X. En la figura 24, se muestra que al primer día de exposición a *Azospirillum*, las plántulas presentan una promoción en la inducción (etapa I) y una aceleración del desarrollo (etapas IV, V, VI y VII) de los PRL. Al día tres de exposición a la bacteria, las plántulas mostraron una estimulación del desarrollo de los primordios hasta la etapa VII. Mientras que a los 6 y 9 días no se observó ningún efecto de la bacteria sobre el desarrollo de los PRL, lo cual podría deberse a que en estos tiempos de exposición la mayoría de los PRL ya emergieron como raíces laterales. En resumen, *Azospirillum* en el primer día de exposición induce y acelera el desarrollo de los PRL de *Arabidopsis*.

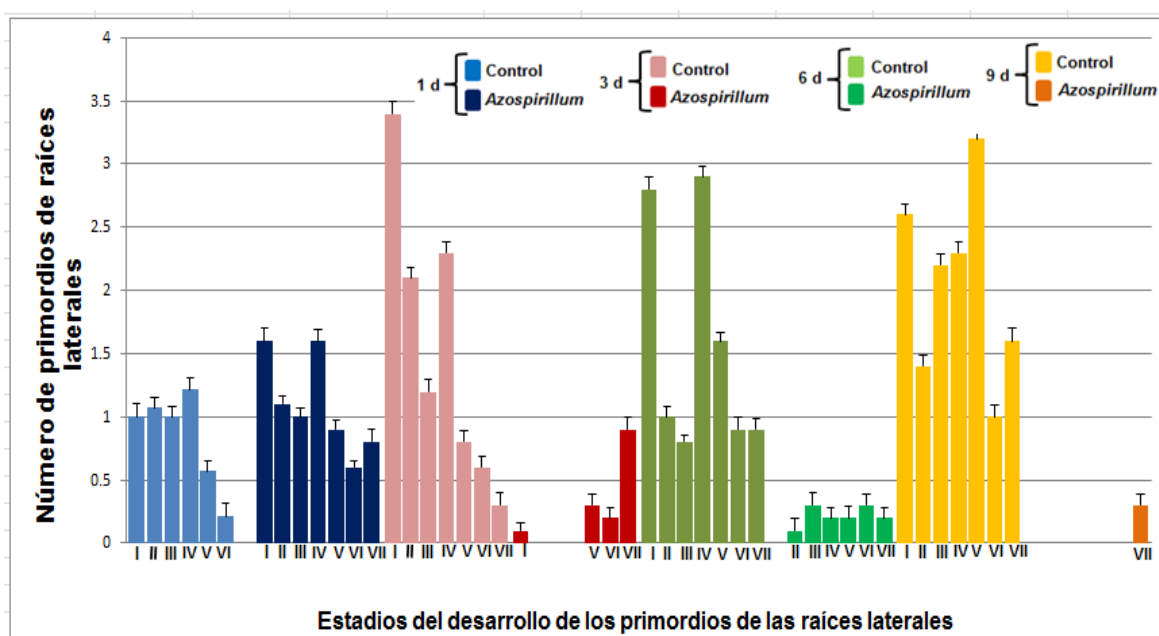


Figura 24. Desarrollo de los primordios de las raíces laterales de *Arabidopsis* en presencia de *Azospirillum*. Plántulas *DR5::uidA* de 5 dde fueron transferidas a un medio control y a otro inoculado con 2.5×10^5 UFC/mL de *Azospirillum*, donde se incubaron durante 1, 3, 6 y 9 d. En cada día de exposición a la bacteria, se contaron los PRL en los distintos estadios de desarrollo. Los valores representan el promedio de 25 plántulas \pm error estándar. Los experimentos fueron repetidos tres veces con resultados similares.

8.3 *Azospirillum* altera el nivel de las auxinas en la raíz de *Arabidopsis thaliana*

Ha sido reportado que *Azospirillum* produce varios fitorreguladores entre ellos las auxinas, las cuales son las fitohormonas que participan en la regulación de prácticamente todos los procesos del desarrollo vegetal (Ljung *et al.*, 2001; Benjamins y Scheres, 2008). Spaepen *et al.*, (2014) propusieron que *Azospirillum* alteraba la arquitectura radicular de *Arabidopsis* al incrementar el nivel de auxinas en la planta. Debido a que *Azospirillum* produce auxinas y las plántulas de *Arabidopsis* expuestas a la bacteria presenta el mismo el fenotipo en la arquitectura radicular al observado en plántulas crecidas en altas concentraciones de auxinas. Se analizó el efecto del nivel de auxinas en plántulas de *Arabidopsis* al exponerlas a *Azospirillum* a diferentes tiempos, cultivando plántulas de *Arabidopsis DR5::uidA* de 5 dde en medios de cultivo sin y suplementados con 2.5×10^5 UFC/mL de *Azospirillum* y se incubaron en las condiciones antes mencionadas durante 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 9 días más. Como se puede observar en la figura 25B, en los dos primeros días de exposición a *Azospirillum*, el nivel de auxinas en el meristemo de la raíz primaria fue similar al control. Al día tres de interacción, el marcador de auxinas se observó en las plántulas tanto en el meristemo como en el haz vascular de la raíz primaria. A los cuatro días de exposición a la bacteria, el nivel de auxinas se localizó en el meristemo de la raíz primaria, se incrementó en la zona de diferenciación de las RL (Fig. 25B) y se relocalizó en los meristemos de las RL (Fig. 25A). A partir del día cinco, el nivel de auxinas desapareció del meristemo de la raíz primaria (Fig. 25B), disminuyó en la zona de diferenciación de las RL (Fig. 25A) y se mantuvo en los meristemos de las RL. Al día seis, el marcador de auxinas se localizó en la zona de diferenciación de las RL y en los meristemos de las mismas. Finalmente al día nueve, las auxinas solo se localizaron en los meristemos de las RL (Fig. 25A y 25B).

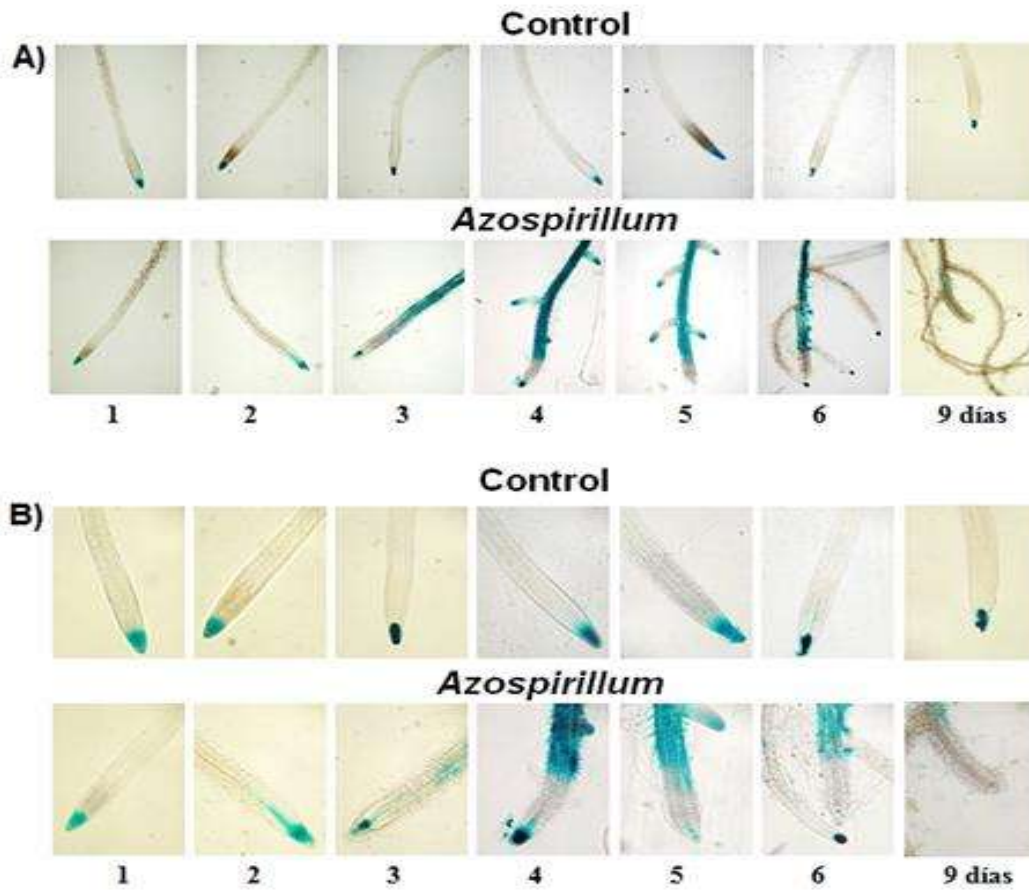


Figura 25. Efecto de *Azospirillum brasilense* Sp245 sobre el nivel de auxinas en las raíces de *A. thaliana*. Plántulas de *Arabidopsis* DR5::uidA de 5 dde transferidas a medios control y suplementados con 2.5×10^5 UFC/mL de *Azospirillum* se incubaron durante 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 9 d. Al finalizar el tiempo de incubación las plántulas fueron tratadas con X-Gluc, seguido de un proceso de aclaramiento. Las plántulas se montaron en portaobjetos y se realizaron observaciones microscópicas: **(A)** con un aumento 5X y **(B)** 10X. Se muestran las fotografías representativas de las raíces de las plántulas en el medio control e inoculado con *Azospirillum* de al menos 25 plántulas de tres ensayos diferentes con resultados similares.

8.4 Efecto de *Azospirillum brasilense* Sp245 sobre la división celular de los meristemas de la raíz de *Arabidopsis*

El hecho de que el crecimiento de la raíz primaria que se alcanzó en el primer día de exposición a la bacteria quedó detenido (Fig. 23A), podría atribuirse entre otros factores al arresto de la división celular del meristemo de la raíz primaria. Para probar esta hipótesis, se realizó un experimento donde plántulas de la línea reportera *CycB1::uidA* de 5 dde se transfirieron a medios sin y suplementados con 2.5×10^5 UFC/mL de *Azospirillum* donde se incubaron durante 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 9 días más. Se observó al primer día de exposición que el marcador *CycB::uidA* se expresó en el meristemo de la raíz primaria de forma similar al control. Al segundo día de exposición a *Azospirillum*, el nivel del marcador disminuyó en el meristemo de la raíz primaria y a partir del día tres desapareció en dicha zona, observándose solamente en los meristemas de las raíces laterales (Fig. 26).

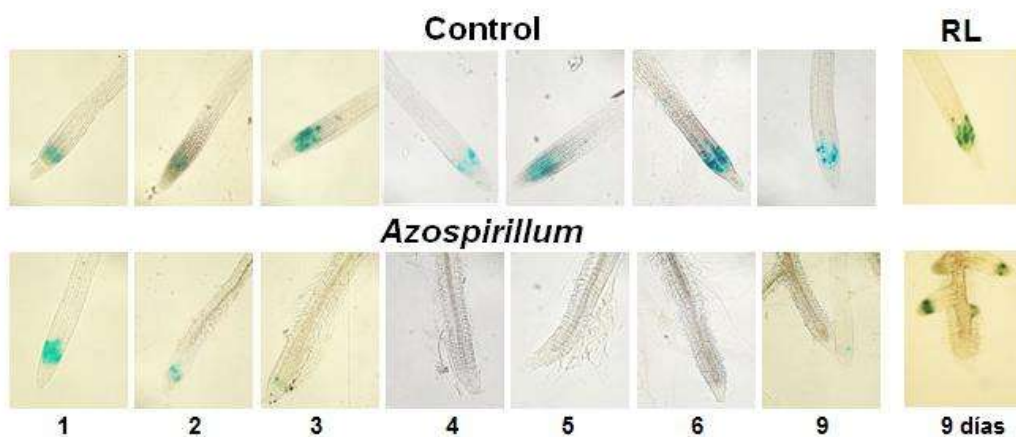


Figura 26. *Azospirillum brasilense* Sp245 altera la expresión de *CycB1::uidA* en la raíz de *Arabidopsis*. Plántulas de *Arabidopsis CycB1::uidA* de 5 dde transferidas a medios control y suplementados con 2.5×10^5 UFC/mL de *Azospirillum*, se incubaron durante 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 9 d más. Al finalizar el tiempo de incubación las plántulas fueron tratadas con X-Gluc, seguido de un proceso de aclaramiento. Las plántulas se montaron en portaobjetos y se realizaron observaciones microscópicas con un aumento 10X. Se muestran las fotografías representativas de las raíces de las plántulas en el medio control e inoculado con *Azospirillum* de al menos 25 plántulas de tres ensayos diferentes con resultados similares.

8.5 Influencia de *Azospirillum brasilense* Sp245 sobre la elongación celular en la raíz de *Arabidopsis*

El arresto en el crecimiento de la raíz primaria de plántulas de *Arabidopsis* expuestas a la bacteria también podría deberse a una alteración en la elongación celular. Para demostrar esta hipótesis, se utilizaron plántulas de la línea *Exp7::uidA* de *Arabidopsis* que marcan específicamente la zona de diferenciación de los pelos radiculares (Cho y Cosgrove, 2002). Plántulas de 5 dde se transfirieron a medios sin y suplementados con 2.5×10^5 UFC/mL de *Azospirillum* donde se incubaron 1, 2, 3, 6 y 9 días más. En la figura 27 se muestra que dicho marcador se expresa en las plántulas control en la zona de diferenciación de los pelos radiculares y abajo de ésta se presenta la zona de elongación. Al segundo día de exposición de plántulas de *Arabidopsis* a la bacteria, se observó una disminución dramática en el tamaño de la zona de elongación y a partir del día tres, dicha zona desapareció. Estos resultados muestran que *Azospirillum* disminuye la longitud de la raíz primaria de *Arabidopsis* afectando tanto la elongación celular como la división celular es decir, la bacteria altera los dos procesos involucrados en el crecimiento de la raíz primaria.

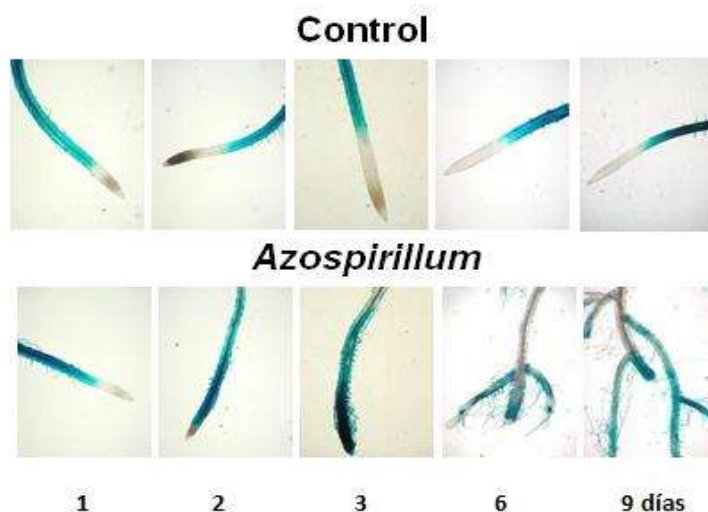


Figura 27. Expresión del marcador *EXP7::uidA* en la raíz de *Arabidopsis* en presencia de *Azospirillum brasilense* Sp245. Plántulas de *Arabidopsis EXP7::uidA* de 5 dde transferidas a medios control y suplementados con 2.5×10^5 UFC/mL de *Azospirillum*, se incubaron durante 1, 2, 3, 6 y 9 d más. Al finalizar el tiempo de incubación las plántulas fueron tratadas con X-Gluc, seguido de un proceso de aclaramiento. Las plántulas se montaron en portaobjetos y se realizaron observaciones con un aumento 10X. Se muestran las fotografías representativas de las raíces de las plántulas en el medio control e inoculado con *Azospirillum* de al menos 25 plántulas de tres ensayos diferentes con resultados similares.

8.6 Participación de algunos componentes de la vía de respuesta a las auxinas en la interacción *Arabidopsis*-*Azospirillum*

La vía de respuesta a las auxinas comprende una gran cantidad de componentes involucrados en los procesos de homeostasis, transporte, percepción, señalización y transcripción de genes de respuesta a las auxinas (Strader y Zhao, 2016). Debido a que los cambios en la arquitectura radicular de *Arabidopsis* por efecto de *Azospirillum* son similares a los provocados por altos niveles de auxinas (Ljung *et al.*, 2001; Benjamins y Scheres, 2008). En base a los resultados obtenidos al analizar el nivel de auxinas a diferentes tiempos de exposición a *Azospirillum* (Fig. 25), se decidió determinar que componentes de la vía de respuesta a auxinas podrían estar participando en dicho efecto. Para esto, las plántulas de 5 dde de las líneas mutantes *yucca3 yucca6*, *aux1-7*, *pin1*, *pin2*, *pin3*, *axr1-3*, *tir1 afb2 afb3*, *slr1* y *arf7 arf19* se transfirieron a medios sin y suplementados con 2.5×10^5 UFC/mL de *Azospirillum* y posteriormente se incubaron 9 días más en las condiciones antes mencionadas. Se observó una disminución alrededor del 70% en la LRP

en todas las mutantes, al igual que en la Wt en presencia de la bacteria (Fig. 28A) lo que sugiere que en la alteración de este parámetro por efecto de la bacteria no participan ninguno de estos componentes de la vía de respuesta a auxinas. Respecto al desarrollo de las raíces laterales, podemos observar en las mutantes *yucca3 yucca6*, *aux1-7*, *pin1*, *pin2*, *pin3* y *axr1-3* un incremento aproximado del 100% en el NRL al igual que en la línea silvestre (Wt) (Fig. 28B). Interesantemente, la triple mutante del receptor nuclear de auxinas *tir1afb2afb3* incrementó el NRL en un 1,241% lo que indica que es hipersensible a las auxinas producidas por *Azospirillum* y sugiere que en estas condiciones, este receptor podría estar regulando negativamente el desarrollo de las RL de *Arabidopsis*. Por otra parte, las mutantes *slr1* y *arf7arf19* no incrementaron el NRL en presencia de *Azospirillum* (Fig. 28B), lo que sugiere que sólo estos dos elementos de la vía de respuesta a las auxinas son requeridos para inducir el desarrollo de las RL por efecto de la bacteria.

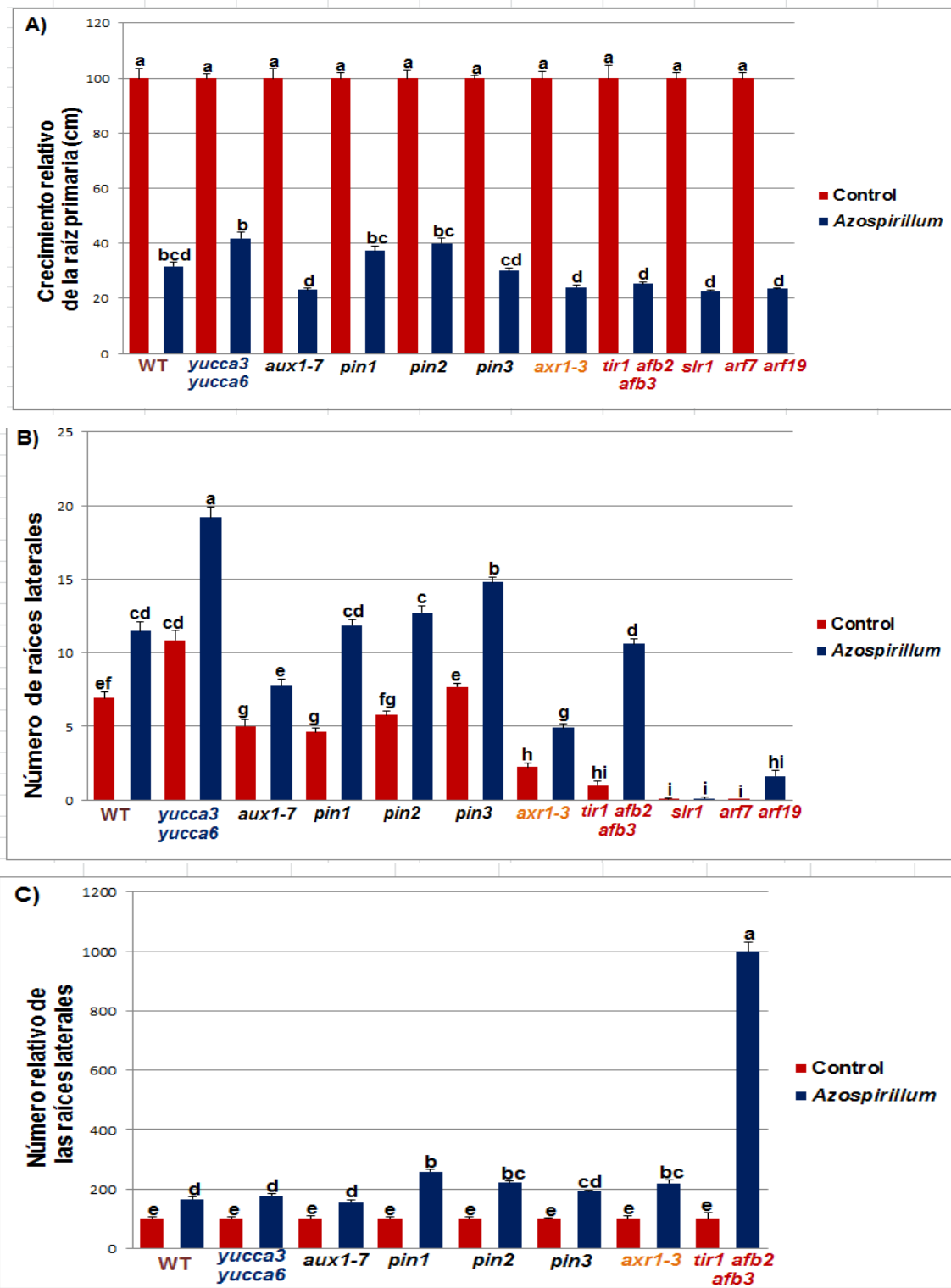


Figura 28. Efecto de *Azospirillum brasilense* Sp245 sobre la arquitectura radicular en las mutantes de *Arabidopsis* en el transporte, percepción y señalización de las auxinas. A) Crecimiento de la raíz primaria basado en los valores del tratamiento control relativos a 100. B) Número de raíces laterales. C) Número de las raíces laterales basado en los valores del tratamiento control relativos a 100. Los valores representan el promedio de 25 plántulas +/- error estándar. Las letras indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con una prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Los experimentos fueron repetidos tres veces con resultados similares.

8.7 *Azospirillum brasilense* Sp245 estimula el desarrollo de las raíces laterales de *Arabidopsis* a través de proteínas que participan en la localización de los acarreadores de auxinas

Debido a que ninguna de las mutantes en el transporte de auxinas (*aux1-7*, *pin1*, *pin2* y *pin3*) presentaron un comportamiento diferente a la línea Wt sobre la inducción de las RL de *Arabidopsis* en presencia de la bacteria y al hecho de que *Azospirillum* incrementó el nivel de auxinas en la raíz de *Arabidopsis* al cuarto día de exposición y en días posteriores las auxinas se distribuyeron a los meristemas de las RL, se decidió analizar si la proteína AXR4-1, que participa en la localización del transportador de auxinas AUX1/LAX (Hobbie y Estelle, 1995) y BEN2 involucrada en la localización del transportador de auxinas PIN (Tanaka *et al.*, 2013) estarían involucradas en el efecto de la bacteria. Plántulas mutantes *axr4-1* y *ben2* de 5 dde se transfirieron a medios sin y suplementados con 2.5×10^5 UFC/mL de *Azospirillum* y posteriormente se incubaron 9 días más en las condiciones antes mencionadas. Los resultados mostraron que en las plántulas de 14 dde de *axr4-1* y *ben2* expuestas durante 9 días a la bacteria al igual que la Wt, disminuyó la LRP alrededor del 72%, mientras que a diferencia de la línea silvestre, dichas mutantes no presentaron una alteración significativa en el NRL (Fig. 29), lo que sugiere que ambas proteínas podrían estar involucradas en la estimulación del desarrollo de las RL de *Arabidopsis* por efecto de *Azospirillum*.

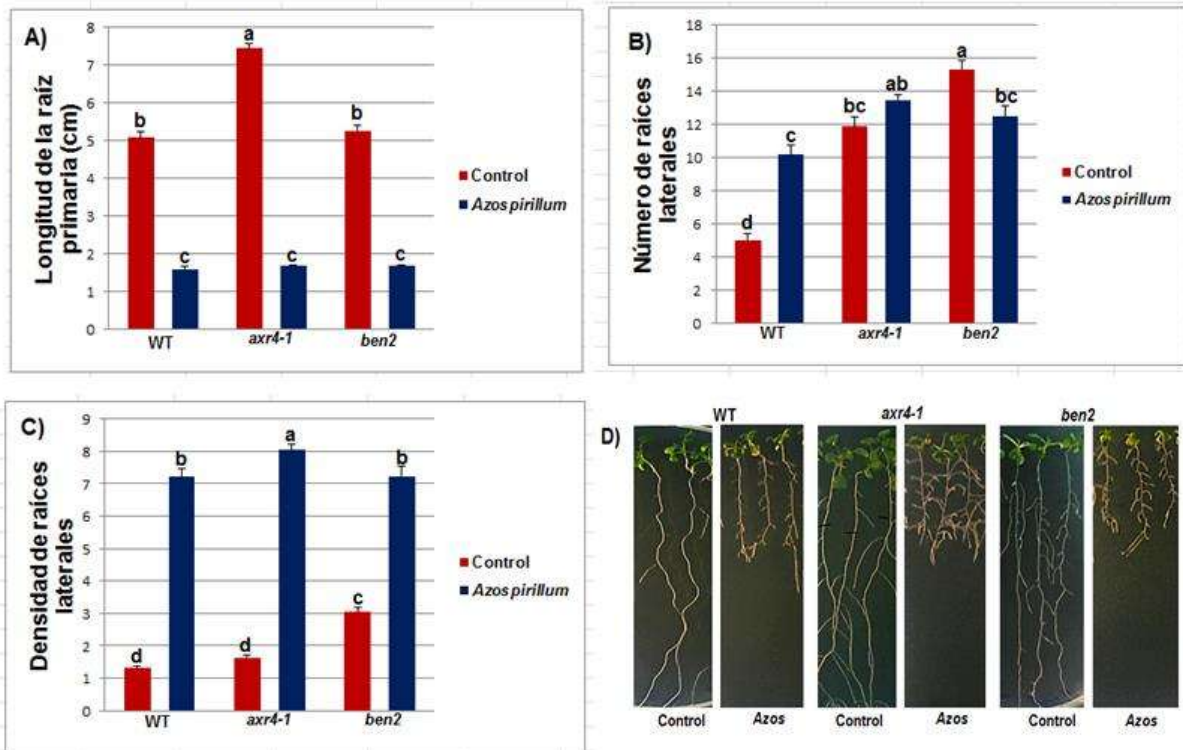


Figura 29. Efecto de *Azospirillum brasilense* Sp245 sobre la arquitectura radicular de las mutantes *axr4-1* y *ben2* de *Arabidopsis*. Plántulas *axr4-1* y *ben2* de *Arabidopsis* de 5 dde transferidas a un medio control y suplementados con 2.5×10^5 UFC/mL de *Azospirillum* e incubadas 9 d más. **A)** Longitud de la raíz primaria. **B)** Número de raíces laterales. **C)** Densidad de las raíces laterales. **D)** Fotografía representativa de las plántulas WT, *axr4-1* y *ben2*. Los valores representan el promedio de 25 plántulas +/- error estándar. Las letras indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con una prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Los experimentos fueron repetidos tres veces con resultados similares.

Debido al hecho de que *Azospirillum* incrementó el nivel de auxinas al cuarto día de exposición y en días posteriores las auxinas se distribuyeron a los meristemos de las RL de *Arabidopsis*, también se decidió analizar el efecto de *Azospirillum* en las mutantes de otro tipo de transportadores de las auxinas como son las proteínas PGP/MDR (Bailly *et al.*, 2008). Para ello, plántulas de las líneas mutantes *pgp1*, *pgp4* y *pgp19* de 5 dde se transfirieron a medios sin y suplementados con 2.5×10^5 UFC/mL de *Azospirillum* y posteriormente se incubaron 9 días más en las condiciones antes mencionadas. Como se

puede observar en figura 30A, en las plántulas de las mutantes *pgp1*, *pgp4* y *pgp19* se presentó una disminución en la LRP alrededor del 78% y un aumento en el NRL en las líneas *pgp4* y *pgp19* similar al observado en la línea silvestre. Interesantemente, solamente en la mutante *pgp1* no se presentó un incremento en el NRL (Fig. 30B), lo que sugiere que el transportador PGP1 es requerido en la estimulación del desarrollo de las RL de *Arabidopsis* inducida por la bacteria.

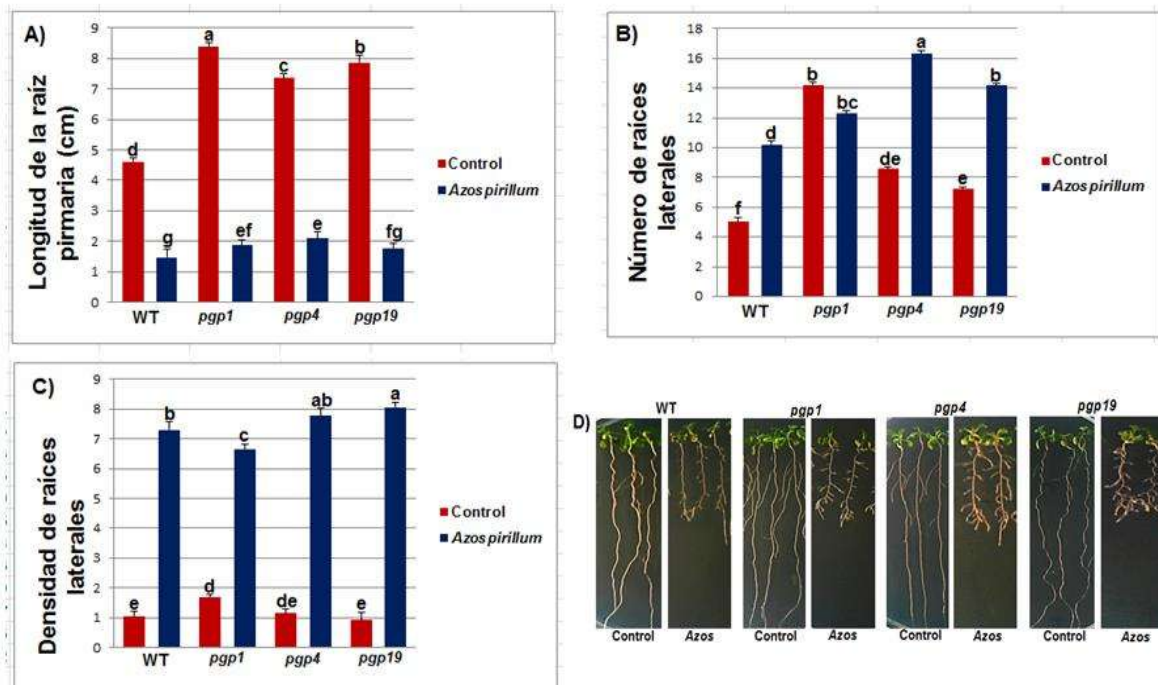


Figura 30. Efecto de *Azospirillum brasilense* Sp245 sobre la arquitectura radicular de las mutantes *pgp1*, *pgp4* y *pgp19* de *Arabidopsis*. Plántulas Wt, *pgp1*, *pgp4* y *pgp19* de *Arabidopsis* de 5 dde transferidas a un medio control y suplementados con 2.5×10^5 UFC/mL de *Azospirillum* e incubadas durante 9 días más. **A)** Longitud de la raíz primaria. **B)** Número de raíces laterales. **C)** Densidad de las raíces laterales. **D)** Fotografía representativa de las plántulas. Los valores representan el promedio de 25 plántulas \pm error estándar. Las letras indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con una prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Los experimentos fueron repetidos tres veces con resultados similares.

Las auxinas se sintetizan en el ápice del follaje, hojas jóvenes y en el meristemo de la raíz y se redistribuyen a otros tejidos donde afectan una gran variedad de procesos del desarrollo vegetal como la formación de raíces laterales, la dominancia apical, el desarrollo de hojas y flores y las respuestas a estímulos ambientales (Ljung *et al.*, 2001; Ljung *et al.*, 2005). El ácido N-1-naftiltalámico (NPA) es el inhibidor de eflujo de auxinas mejor caracterizado, sus efectos inhibitorios en los sistemas de transporte de auxinas llevan a la supresión de la elongación y el crecimiento diferencial de los hipocotilos en *Arabidopsis* (Ma y Robert, 2013). El NPA actúa como un inhibidor específico del AIA teniendo como blanco principal a los transportadores tipo ABCB (Bailly *et al.*, 2008; Nagashima *et al.*, 2008) y ha sido ampliamente utilizado como una valiosa herramienta química en la investigación de la función del Transporte Polar de Auxinas (TPA) y sus efectos sobre el desarrollo vegetal. Con la finalidad de evaluar el efecto del NPA sobre los cambios en la arquitectura radicular en presencia de la bacteria, para lo cual plántulas Wt de 5 dde se transfirieron a medios sin y suplementados con 2.5×10^5 UFC/mL de *Azospirillum* y estos mismos medios adicionados con $1 \mu\text{M}$ NPA. Posteriormente, el material se incubó 3, 6 y 9 días más en las condiciones antes mencionadas. Los resultados mostraron en las plántulas Wt de 5 dde en presencia de *Azospirillum* y *Azospirillum* más NPA, una disminución en la LRP alrededor del 70% a diferentes tiempos de exposición a la bacteria (Fig. 31A), mientras que el NRL en presencia de *Azospirillum* y NPA incrementó en menor proporción que las plántulas tratadas solo con la bacteria y en forma similar a las plántulas control (Fig. 31B). Estos resultados muestran que la inhibición del TPA impide el efecto promotor del desarrollo de las raíces laterales de *Arabidopsis* por la bacteria.

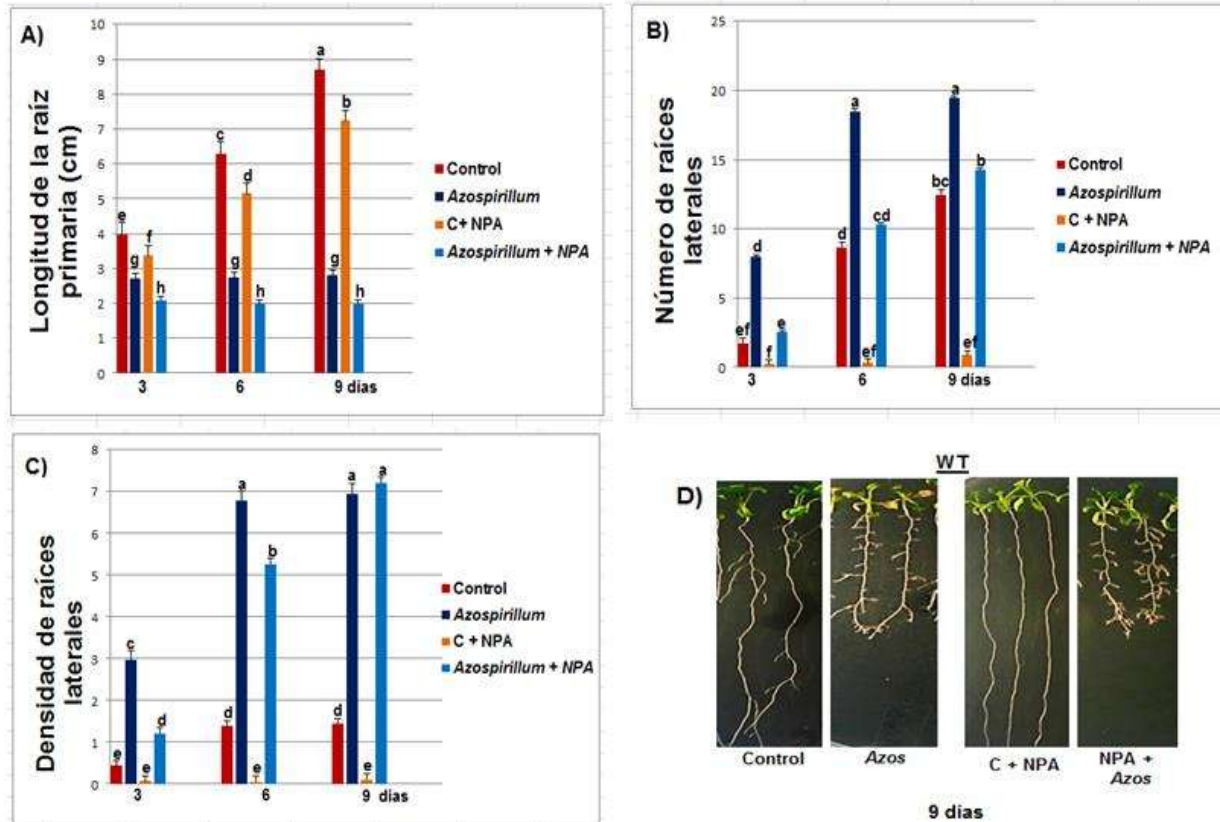


Figura 31. Efecto de *Azospirillum brasilense* Sp245 sobre la arquitectura radicular de *Arabidopsis* en presencia del inhibidor NPA. Plántulas WT de *Arabidopsis* de 5 dde transferidas a medios control y suplementado con 2.5×10^5 UFC/mL de *Azospirillum*, y estos mismos medios adicionados con NPA ($1 \mu\text{M}$) e incubadas 9 días más. **A)** Longitud de la raíz primaria. **B)** Número de raíces laterales. **C)** Densidad de las raíces laterales. **D)** Fotografía representativa de las plántulas. Los valores representan el promedio de 25 plántulas \pm error estándar. Las letras indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con una prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Los experimentos fueron repetidos tres veces con resultados similares.

8.8 Participación de la citocininas en el efecto de *Azospirillum* sobre el desarrollo de la arquitectura radicular de *Arabidopsis*

Se analizó si las CK podrían estar participando en el efecto de *Azospirillum* sobre la estimulación de la RL de *Arabidopsis*. Plántulas mutantes en el receptor de las CK, *ahk2-2* y la doble mutante *cre1-12 ahk2-2* de *Arabidopsis* de 5 dde se transfirieron a medio sin y suplementado con 2.5×10^5 UFC/mL de *Azospirillum* y se incubaron 9 días más. Las

plántulas *ahk2-2* y *cre1-12 ahk2-2* de 14 dde expuestas durante 9 días a la bacteria mostraron al igual que las plántulas silvestres una disminución del 78% en la LRP y un ligero gravitropismo respecto a las plántulas control, mientras que el NRL en la mutante *ahk2-2* disminuyó y aumentó ligeramente en las *cre1-12 ahk2-2* respectivamente (Fig. 32). El comportamiento de dichas mutantes sobre el desarrollo de las raíces laterales fue diferente al mostrado por la línea silvestre, lo que sugiere que las CK podrían estar implicadas en el efecto de la bacteria sobre el desarrollo de las RL.

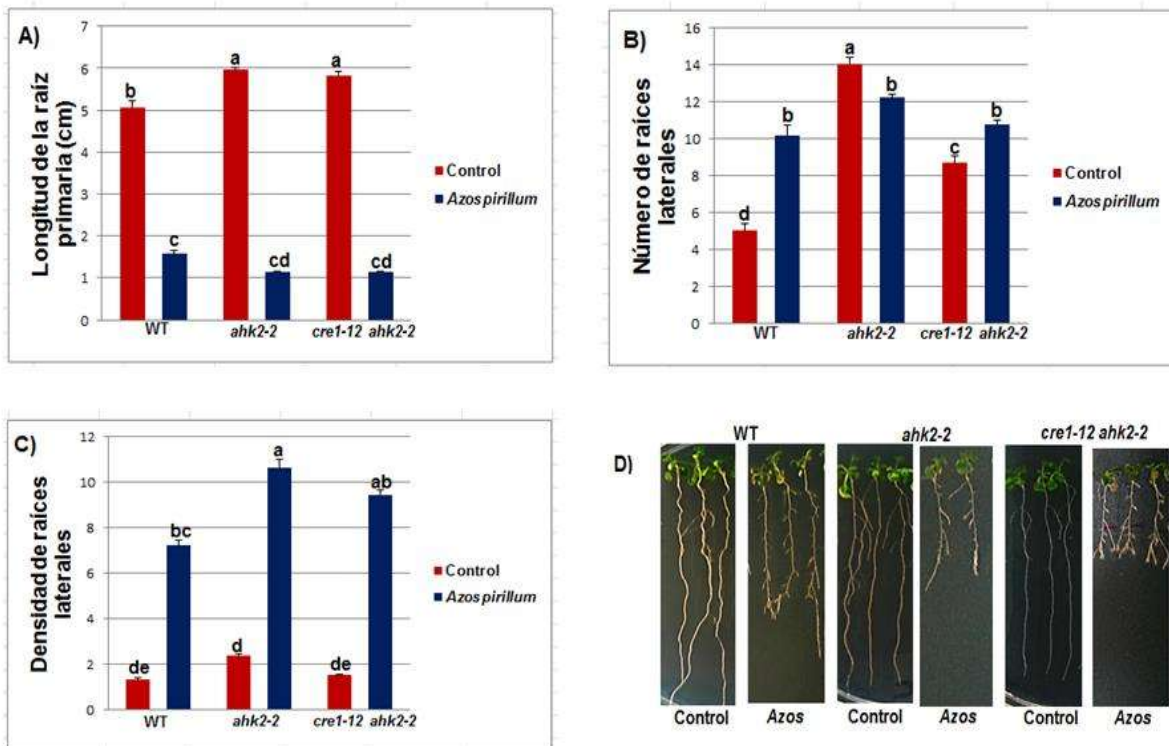


Figura 32. Efecto de *Azospirillum* sobre la arquitectura radicular de las mutantes del receptor de las citocininas de *A. thaliana*. A) Longitud de la raíz primaria. B) Número de raíces laterales. C) Densidad de raíces laterales y D) Fotografías representativas de las plántulas WT y *ahk2-2* y *cre1-12 ahk2-2* en el medio control e inoculado con 2.5×10^5 UFC/mL de *Azospirillum*. Los valores representan el promedio de 25 plántulas \pm error estándar. Las letras indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Los experimentos fueron repetidos tres veces con resultados similares.

8.9 Participación del etileno sobre el efecto de la interacción *Arabidopsis*-*Azospirillum*

Para analizar si el etileno podría estar participando en el efecto de *Azospirillum* sobre el desarrollo de las RL de *Arabidopsis*, plántulas mutantes en *etr1*, *ein2* y *ein3* de *Arabidopsis* de 5 dde se transfirieron a medio sin y suplementado con 2.5×10^5 UFC/mL de *Azospirillum* y se incubaron 9 días más. En la figura 33 se observa una disminución de la LRP en las plántulas de 14 dde en las tres mutantes ensayadas al igual que la silvestre de alrededor del 70% en la LRP. Mientras que el incremento en el NRL en las tres mutantes no fue significativo, a diferencia de las plántulas Wt. Estos resultados sugieren que tanto el receptor del etileno ERT1, como los factores de transcripción EIN2 y EIN3 podrían estar involucrados en el desarrollo de las RL en *Arabidopsis* estimulado por la bacteria.

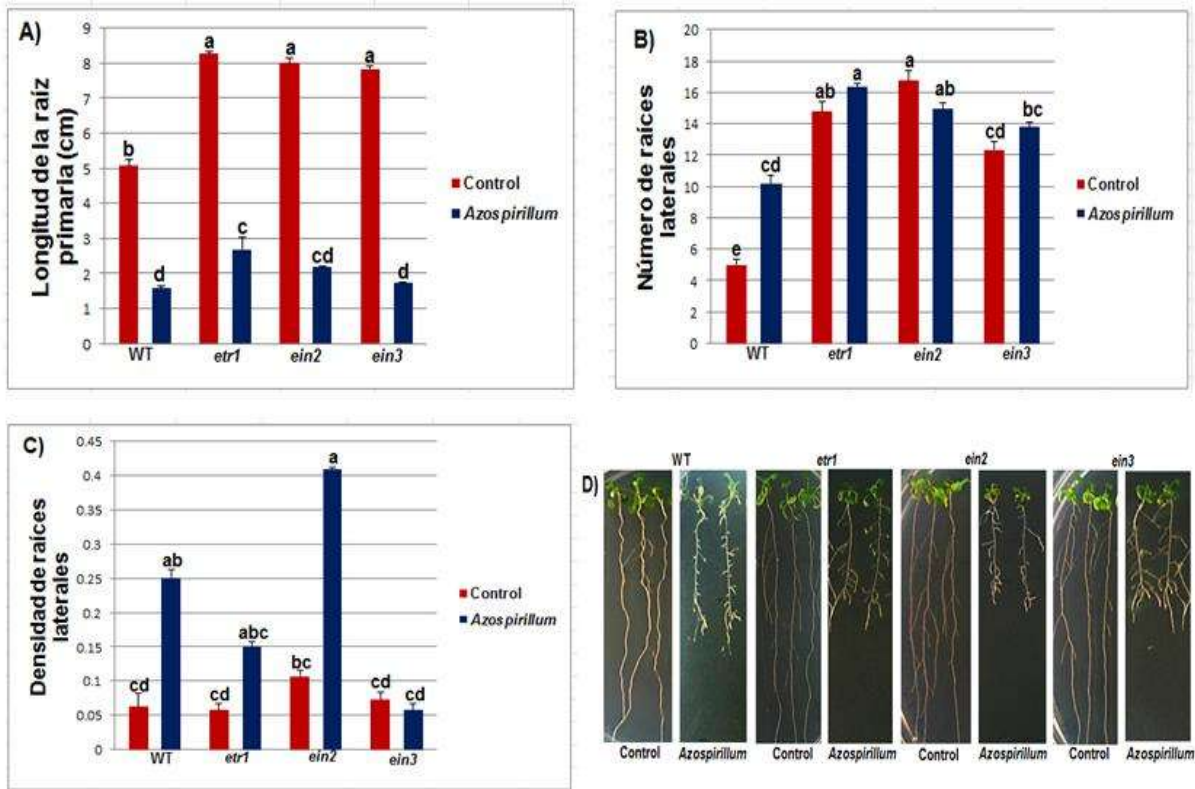


Figura 33. Efecto de *Azospirillum* sobre la arquitectura radicular de las mutantes de señalización del etileno de *A. thaliana*. A) Longitud de la raíz primaria. B) Número de raíces laterales. C) Densidad de raíces laterales y D) Fotografías representativas de las plántulas Wt, *etr1*, *ein2* y *ein3* en el medio control e inoculado con 2.5×10^5 UFC/mL de *Azospirillum*. Los valores representan el promedio de 25 plántulas \pm error estándar. Las letras indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Los experimentos fueron repetidos tres veces con resultados similares.

9. RESUMEN DE RESULTADOS

- *Azospirillum* disminuye la LRP e incrementa el NRL de *Arabidopsis* de manera independiente de la concentración de la bacteria. Conforme transcurren los días de exposición a *Azospirillum* se presenta un arresto del crecimiento de la raíz primaria desde el primer día de exposición y un aumento del NRL.
- *Azospirillum* induce y acelera el desarrollo de los PRL de *Arabidopsis* en el primer día de exposición.
- *Azospirillum* aumenta el nivel de auxinas en la zona de diferenciación de las RL de *Arabidopsis* desde el cuarto día de exposición y posteriormente la plántula redistribuye a las auxinas hacia los meristemos de las RL.
- La detención del crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis* en presencia de la bacteria se debe a un arresto de la división celular del meristemo y a la desaparición de la zona de elongación durante los primeros días de la interacción.
- Las líneas mutantes de *Arabidopsis* en síntesis, transporte y señalización de las auxinas fueron igualmente sensibles a *Azospirillum* en la disminución de la LRP que la línea silvestre. Respecto al desarrollo de las RL, la triple mutante del receptor de las auxinas *tir1afb2afb3* resultó hipersensible a la presencia de la bacteria, lo que sugiere que *Azospirillum* podría estar regulando negativamente el desarrollo de las RL. Solamente el represor SLR1/IAA14 y los factores de transcripción ARF7 y ARF19 fueron indispensables para que la presencia de la bacteria estimulara el desarrollo de las RL de *Arabidopsis*.
- *Azospirillum* requiere para estimular el desarrollo de las RL de *Arabidopsis* a las proteínas AXR4 y BEN2, involucradas en la localización correcta de los transportadores de influjo y eflujo respectivamente. Así como también el transportador de eflujo de auxinas PGPI parece ser requerido en este proceso.
- La alteración del TPA en presencia del inhibidor NPA disminuye el efecto promotor de *Azospirillum* sobre el desarrollo de las RL en *Arabidopsis*.

- El incremento en el NRL de las plántulas silvestres estimulado por *Azospirillum* fue abolido en las mutantes del receptor de citocininas *ahk2-2* y *cre1-12 ahk2-2* y del receptor *etr1* y de los factores transcripcionales de la vía del etileno *ein2* y *ein3*, lo que sugiere que la señalización de las citocininas y del etileno podrían estar participando en dicho efecto.

10. DISCUSIÓN

Las raíces son los órganos de absorción de nutrientes y agua que contribuyen en el establecimiento de poblaciones microbianas 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 las 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 cuales disminuyen la longitud de la raíz primaria e incrementan el número de las raíces laterales y de los pelos radiculares (Lugtenberg y Kamilova, 2009; Spaepen *et al.*, 2009; Spaepen *et al.*, 2014). *Azospirillum* ha sido aislado de la rizósfera de cultivos de importancia económica tales como el maíz, el trigo y el arroz, 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).

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 (Somers *et al.*, 2005). Debido a que *Azospirillum* altera la arquitectura radicular de las plantas, en el presente estudio se investigó si este efecto podría ser dependiente de la

concentración de la bacteria. Se observó en la figura 21 en las tres concentraciones de *Azospirillum* ensayadas 2.5×10^4 , 2.5×10^5 y 2.5×10^6 UFC/mL, en las plántulas de *Arabidopsis* una disminución del 70% en la LRP y un aumento del 100% en el NRL, lo que está de acuerdo con lo reportado por Spaepen *et al.*, 2014, donde no observaron diferencias en los parámetros de la arquitectura radicular de plántulas de *Arabidopsis* crecidas en medios suplementados con 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 UFC/mL de *Azospirillum*. Así que, *Azospirillum* altera la arquitectura radicular de *Arabidopsis* independientemente de la concentración de la bacteria.

El análisis del efecto de *Azospirillum* a diferentes tiempos de exposición sobre la arquitectura radicular de *Arabidopsis* mostró que el crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis* alcanzado en el primer día de exposición a la bacteria se mantuvo durante la cinética. En tanto que el NRL incrementó paulatinamente conforme transcurrían los días de exposición a la bacteria (Fig. 23). Se analizó como *Azospirillum* induce el desarrollo de las RL en *Arabidopsis*, para lo cual se expusieron plántulas a la bacteria a diferentes tiempos y se evaluaron los estadios del desarrollo de los primordios de las raíces laterales (PRL), donde se observó que en el primer día de exposición, la bacteria estimula la inducción (etapa I) y acelera el desarrollo (etapas IV, V, VI y VII) de los PRL (Fig. 24).

Como observamos en la figura 23, *Azospirillum* incrementó el NRL en *Arabidopsis* conforme transcurrían los días de exposición a la bacteria y debido a que las auxinas promueven el desarrollo de estas estructuras, se analizó el nivel de auxinas en las plántulas de la línea reportera *DR5::uidA* de *Arabidopsis* a diferentes tiempos de exposición a *Azospirillum*. La figura 25 muestra que al tercer y cuarto día de exposición a la bacteria, las auxinas se incrementaron en la zona de diferenciación de la RP y se localizaron solamente en los meristemos de las RL. A partir del quinto día de exposición, las auxinas desaparecieron del meristemo de la RP y se localizaron en los meristemos de las RL. Spaepen *et al.*, 2014 en plántulas *DR5::uidA* de *Arabidopsis* de 7 dde expuestas siete días a 4×10^6 UFC/mL de *Azospirillum*, observaron un gran incremento en el nivel de auxinas en todos los tejidos de las plántulas, este efecto en nuestros ensayos solamente se presentó en plántulas expuestas por cuatro días a la bacteria (junto con la formación de un máximo de

auxinas en los meristemos de las RL) y posteriormente las auxinas se localizaron en los meristemos de las RL. Los resultados de Spaepen *et al.*, 2014 nos parecen sumamente extraños, debido a que la localización de máximos de auxinas es un requisito indispensable para el mantenimiento funcional de los meristemos, los cuales abastecen de células para el crecimiento de los diferentes tejidos de las plantas. Además, como una gran cantidad de auxinas podría inhibir el crecimiento de la planta, pensamos que la disminución del nivel de auxinas a partir del quinto día de exposición y su posterior redistribución a los meristemos de las RL podría deberse a un mecanismo de protección de la planta. Mientras que el mantenimiento de un máximo de auxinas en los meristemos de las RL estimularía el desarrollo de estas para compensar el agotamiento del meristemo de la RP. Como ha sido ampliamente reportado, el crecimiento de la raíz primaria depende tanto de la división como de la expansión celular y ambos procesos son regulados por las auxinas (Kalve *et al.*, 2014) y debido a que *Azospirillum* detuvo el crecimiento de la RP de *Arabidopsis* desde los primeros días de interacción; se analizó a diferentes tiempos de exposición a *Azospirillum* cómo estaba afectada la división celular, utilizando la línea reportera *CycB1::uidA* y la elongación celular con la línea *Exp7::uidA*, la cual marca la zona de diferenciación de pelos radiculares (Cho y Cosgrove, 2002). Al segundo día de exposición a la bacteria, observamos una disminución de la división celular respecto al control y a partir del tercer día la desaparición del meristemo de la RP y la localización del marcador solo en los meristemos de las RL (Fig. 26). Mientras que en la línea *Exp7::uidA* al segundo día de exposición la zona de elongación se redujo considerablemente y a partir del tercer día desapareció (Fig. 27).

Así que *Azospirillum* detiene el crecimiento de la RP, inhibiendo a tiempos tan cortos como 72 h de exposición, los dos procesos que regulan el crecimiento de este órgano. A diferencia de nuestros resultados, Ayala-Rodríguez *et al.*, 2017 al evaluar la división y elongación celular de la RP de *Arabidopsis* en presencia de ácido fólico observaron que la detención del crecimiento de la RP se debía sólo a una inhibición de la elongación celular.

Para determinar si en el arresto del crecimiento de la RP y el aumento del NRL en *Arabidopsis* por efecto de *Azospirillum*, estaban involucradas las auxinas, ya que este fenotipo radicular es similar al que se presenta a concentraciones altas de esta fitohormona, se analizó qué elementos de la vía de respuesta a las auxinas podrían estar participando. En la figura 28, se puede observar que en las mutantes en síntesis *yucca3 yucca6*, transporte de influjo *aux1-7*, de eflujo *pin1, pin2, pin3* y señalización de las auxinas *axr1-3, slr1/IAA14* y *arf7 arf19* en presencia de *Azospirillum*, disminuyó la LRP alrededor del 70% y aumentó el NRL en un 100% al igual que en la línea silvestre. Interesantemente, solo la triple mutante del receptor nuclear de las auxinas *tir1 afb2 afb3* presentó una hipersensibilidad en el aumento del NRL en presencia de *Azospirillum* (Fig. 28C), mientras que las mutantes *slr1/IAA14* y *arf7 arf19* no indujeron un incremento en el NRL *Azospirillum* (Fig. 28B). Estos resultados sugieren que el receptor nuclear de auxinas podría estar regulando negativamente el desarrollo de las RL, debido al incremento dramático en el NRL en la mutante *tir1/afb2/afb3*. Por otra parte, la resistencia al aumento en el NRL en presencia de *Azospirillum* observada en las mutantes de señalización de auxinas, *slr1/IAA14* y *arf7 arf19* correlaciona perfectamente con el hecho de que este represor y estos factores transcripcionales están involucrados en prácticamente todos los módulos de señalización de las auxinas que participan en el desarrollo de las RL (Lavenus *et al.*, 2013).

Es importante destacar que al igual que la alteración que ocasiona *Azospirillum* sobre la arquitectura radicular de *Arabidopsis*, la disminución en la LRP y el aumento en el NRL se ha reportado como un efecto general de las PGPR sobre la arquitectura radicular de las plantas (Verbon y Liberman. 2010). Dicho fenotipo también ha sido observado en altas concentraciones de auxinas (Simon *et al.*, 2013) y en las interacciones de *Arabidopsis* y Poplar con el hongo ectomicorrizal *Laccaria bicolor*, donde la estimulación del desarrollo de la raíces laterales por la acumulación de las auxinas en los ápices radiculares depende del transportador PIN2 durante la fase de interacción temprana (Felten *et al.*, 2009). Mientras que *Phyllobacterium brassicacearum STM196* alivia la inhibición del desarrollo de las raíces laterales en *Arabidopsis* provocada por un alto suministro de nitratos. Esta bacteria produce AIA y en *Arabidopsis* incrementa el crecimiento de las RL, dicho efecto

fue completamente abolido en las mutantes *aux1* y *axr1*, las cuales alteran el transporte y la señalización del AIA respectivamente, lo que sugiere que esta vía es requerida (Contesto *et al.*, 2010). Varias cepas de *Pseudomona* spp promueven el crecimiento de las plantas y regulan la plasticidad de la arquitectura radicular de *Arabidopsis*, inhibiendo la elongación de la RP y promoviendo la formación de las RL y pelos radiculares. Por estrategias genéticas y farmacológicas, se demostró la función fundamental de la señalización y el transporte de auxinas en los cambios del sistema radicular estimulados por *Pseudomona* spp (Zamioudis *et al.*, 2013). Por otra parte *Trichoderma atroviride* produce el compuesto volátil 6-pentil-2H-pirano-2-ona (6-PP), el cual de manera dosis dependiente inhibe el crecimiento de la RP e induce la formación de las RL en *Arabidopsis*, lo que correlaciona con la expresión génica de los transportadores de eflujo PIN de las auxinas. También, la expresión génica de los receptores de las auxinas *TIR1*, *AFB2* y *AFB3*, y los factores de transcripción *ARF7* y *ARF9* influyen sobre las respuestas de las RL al 6-PP, mientras que *EIN2* modula la percepción del VOC en la raíz primaria. Así que estos resultados sugieren que las respuestas de la raíces al 6-PP comprende algunos componentes del transporte de auxinas, la señalización y del modulador de respuesta al etileno *EIN2* (Garnica-Vergara *et al.*, 2016). El mismo fenotipo de disminución del crecimiento de la RP, e inducción del desarrollo de las RL en *Arabidopsis* se ha observado por efecto de otros inductores, como la *N*-isobutil decanamida que promueve la síntesis del óxido nítrico, el cual de manera dosis dependiente altera los parámetros antes mencionados (Méndez- Bravo *et al.*, 2010). Por otra parte, la suplementación del ácido fólico (AF, cofactor esencial que funciona como acarreador de unidades de un carbono en reacciones enzimáticas) inhibe la elongación de la RP e induce la formación de las RL en *Arabidopsis* de manera dosis dependiente. Se determinó en la raíz primaria que el AF incrementa la división celular y previene la elongación y este efecto correlaciona con la expresión alterada de los genes involucrados en el transporte de eflujo de las auxinas, PIN. Mientras que las mutantes en los receptores, represores y factores de transcripción de la vía de señalización de las auxinas fueron menos sensibles al AF (Ayala-Rodríguez *et al.*, 2017). Steenackers *et al.*, 2017, mostraron que la plántulas de *Arabidopsis* crecidas en medio suplementado con ácido cis-Cinámico (inhibidor de eflujo de auxinas natural) presentan un fenotipo radicular característico de niveles altos de auxinas, que incluye la inhibición del crecimiento de la RP y promoción

del desarrollo de las RL y adventicias. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el fenotipo de plántulas tratadas con cis-Cinámico es consecuencia de un cambio local en la acumulación de auxinas inducido por la inhibición de eflujo de las auxinas mediada por los transportadores MDR-PGP.

Debido a que en ninguna de las mutantes analizadas en el transporte de influjo (*aux1-7*) y de eflujo (*pin1*, *pin2*, *pin3*) de las auxinas están participando en la estimulación del desarrollo de las RL de *Arabidopsis* por efecto de *Azospirillum* y considerando que en la línea reportera *DR5::uidA* las auxinas se observaron en los meristemos de las RP al cuarto día de exposición y en días posteriores se distribuyeron a los meristemos de las RL, se decidió analizar si las proteínas accesorias como AXR4-1 que participa en la localización del transportador de influjo (Hobbie y Estelle, 1995) y BEN2 en el de eflujo de las auxinas (Tanaka *et al.*, 2013) podrían estar involucradas en el efecto de *Azospirillum* sobre la arquitectura radicular de *Arabidopsis*. Los resultados mostraron que en las mutantes *axr4-1* y *ben2* de 14 dde se detuvo el crecimiento de la RP al igual que en la línea silvestre. Mientras que, a diferencia de la línea silvestre, no se presentó ninguna estimulación en el desarrollo de las NRL en ambas mutantes (Fig. 29), lo que sugiere que *Azospirillum* requiere de ambas proteínas para estimular el desarrollo de las RL en *Arabidopsis*. Los resultados anteriores podrían explicar en parte la redistribución de las auxinas hacia los meristemos de las RL, la cual estaría llevándose a cabo por los transportadores AUX1/LAX y PIN correctamente localizados mediante las proteínas AXR4-1 y BEN2. También se analizó la posible participación de otro tipo de proteínas involucradas en el transporte de eflujo de las auxinas como las PGP/MDR/ABCB.

En presencia de *Azospirillum* de todas las mutantes *pgp* analizadas, solamente la *pgp1* no estimuló el NRL por efecto de *Azospirillum* (Fig. 30), lo que sugiere que el transportador de eflujo PGP1 podría estar involucrado en la estimulación del desarrollo de las RL. Steenackers *et al.*, (2017) reportaron que el inhibidor endógeno del Transporte Polar de Auxinas, el ácido cis-Cinámico altera la arquitectura radicular de *Arabidopsis* de manera similar a los cambios que se presentan en altas concentraciones de auxinas y que la

presencia del inhibidor específico del transportador PGP/MDR/ABCB, 2-[4-(dietilamino)-2-hidroxibenzoico] ácido benzoico (BUM) bloqueó el flujo de auxinas en la misma medida que el c-CA. Estos resultados les permitieron sugerir que el c-CA dirige a las auxinas a través del transporte mediado por las proteínas PGP/MDR/ABCB. Como el TPA es fundamental para el desarrollo vegetal correcto, se decidió evaluar el efecto del inhibidor NPA (Ma y Robert, 2013) sobre los cambios en la arquitectura radicular de *Arabidopsis* a diferentes tiempos de exposición a *Azospirillum*. Los resultados mostraron que dicha inhibición alteró el efecto promotor del desarrollo de las RL de *Arabidopsis* por la bacteria (Fig. 31). Por otra parte, ha sido reportado que *Azospirillum* también produce CK (Tilak y Annapurna, 1993) y que el tamaño y mantenimiento del meristemo radicular depende de un gradiente de auxinas específico que regula la división celular a través del incremento en la expresión de genes que codifican para ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas que participan en la regulación del ciclo celular (Bal *et al.*, 1993; Ferreira *et al.*, 1994; Bursens *et al.*, 2000). Específicamente, las CK promueven la división celular del meristemo de la RP al inducir la acumulación de auxinas mediante la expresión de los transportadores PIN (Ruzicka *et al.*, 2009). Las CK y las auxinas regulan antagónicamente el crecimiento de la RP y el desarrollo de las RL. Debido a esta relación antagónica, en este estudio se utilizaron las líneas mutantes sencillas (*ahk2-2*) y dobles (*cre1-12 ahk2-2*) en la señalización de las CK para evaluar si esta hormona estaría participando en los cambios de la arquitectura radicular de *Arabidopsis* por efecto de *Azospirillum*. Observándose que *Azospirillum* no estimula en las mutantes analizadas el NRL en presencia de la bacteria (Fig. 32), lo que sugiere que la CK podría estar participando en la estimulación del desarrollo de las RL de *Arabidopsis* por efecto de la bacteria.

Se sabe que el etileno tiene funciones importantes en la modulación del tamaño celular, la restricción de la elongación y la división celular, así como la senescencia, abscisión, maduración, respuestas de defensa, estrés biótico y abiótico (Schaller *et al.*, 2015). Altos niveles de auxinas en las plantas mejoran la biosíntesis del precursor del etileno, el ácido 1-aminociclopropano carboxílico (ACC), provocando su acumulación e inhibición del crecimiento radicular (Ahmed y Hasnain, 2014; Glick, 2014). Respecto a la relación entre

las auxinas y el etileno en la estimulación del crecimiento vegetal, existen amplias evidencias de que los microorganismos que producen la ACC desaminasa (enzima que hidroliza el ACC convirtiéndolo en α - cetobutirato y amonio), reducen los niveles de etileno y mejoran el crecimiento vegetal (Bal *et al.*, 2013; Esquivel-Cote *et al.*, 2013; Gamalero y Glick, 2015). Strzelczyk *et al.*, (1994), analizaron la capacidad de *Azospirillum* sobre la producción de la ACC-deaminasa y encontraron que la bacteria sintetiza etileno cuando crece en medios de cultivo suplementados con diferentes fuentes de carbono y en presencia de metionina. En esta investigación, al analizar mutantes en la señalización (*etr1*) y en la respuesta a etileno (*ein2* y *ein3*), se observó que *Azospirillum* no estimula el desarrollo de las RL en presencia de la bacteria (Fig. 33), lo que sugiere que se requiere de la vía completa del etileno para dicha estimulación.

11. CONCLUSIONES

- *Azospirillum* detiene el crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis* en los primeros días de exposición a la bacteria por una disminución en la elongación celular y el arresto en la división celular.
- El aumento del NRL por efecto de la bacteria se debe a una inducción y aceleración del desarrollo de los PRL de *Arabidopsis* durante el primer día de exposición a la bacteria. Así como también por un incremento de auxinas en los meristemas de las RL mediado por el transportador de eflujo PGP1 y las proteínas AXR4 y BEN2 que ayudan a la localización correcta de los transportadores de influjo y eflujo AUX1 y PIN, respectivamente.
- *Azospirillum* requiere para estimular el desarrollo de las RL en *Arabidopsis* de la señalización de las auxinas a través del represor SRL1/IAA y de los factores transcripcionales ARF7 y ARF19. Así como también de la señalización de las citocininas y de la vía de respuesta al etileno.

12. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

Analizar la expresión de los genes involucrados en la homeostasis y transporte de las auxinas en plántulas de *Arabidopsis* con diferentes tiempos (días) de exposición a *Azospirillum*

13. BIBLIOGRAFÍA

- **Achard P., Cheng H., De Grauwe L., Decat J., Schoutteten H., Moritz T., Van Der Straeten D., Peng J. and Harberd N.P. 2006.** Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* 311: 91–94.
- **Ahmed A. and Hasnain S. 2014.** Auxins as one of factors of plant growth improvement by plant growth promoting rhizobacteria. *Pol. J. Microbiol.* 63: 261-266.
- **Annapurna K., Kumar A., Kumar V.L., Govindasamy V., Bose P. and Ramadoss D. 2013.** PGPR-induced systemic resistance (ISR) in plant disease management. Maheshwari H. (ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management* pp. 405-425.
- **Ayala-Rodríguez J.A., Barrera-Ortiz S., Ruiz-Herrera L.F. and López-Bucio J. 2017.** Folic acid orchestrates root development linking cell elongation with auxin response and acts independently of the target of rapamycin signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* 264: 168–178.
- **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.
- **Bal H.B., Das S., Dangar T.K. and Adhya T.K. 2013.** ACC deaminase and IAA producing growth promoting bacteria from the rhizosphere soil of tropical rice plants. *J. Basic Microbiol.* 53: 972-984.
- **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. *J. Mol. Sci.* 16: 19671-19697.
- **Bashan Y. and de-Bashan E.L. 2010.** How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth-a critical assessment. Sparks D.L. (ed.) *Advances in Agronomy* pp. 2-315.
- **Benjamins R. and Scheres B. 2008.** Auxin: the looping star in plant development. *Plant Biol.* 59: 443-465.
- **Benková E., Michniewicz M., Sauer M., Teichmann T., Seifertova D., Jurgens G. and Friml J. 2003.** Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115: 591-602.
- **Binder B.M., Walker J.M., Gagne J.M., Emborg T.J., Hemmann G., Bleecker A.B. and Vierstra R.D. 2007.** The *Arabidopsis* EIN3 binding F-Box proteins EBF1 and EBF2 have distinct but overlapping roles in ethylene signaling. *Plant Cell* 19: 509-523.
- **Bishopp A., Mähönen A. and Helariutta Y. 2006.** Signs of change hormone receptors that regulate plant development. *Development* 133: 1857-1869.

- **Bleecker A.B. and Kende H. 2000.** Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 1-18.
- **Burdman S., Jurkevitch E., Schwartsburd B., Hampel M. and Okon Y. 1998.** Aggregation in *Azospirillum brasilense*: effects of chemical and physical factors and involvement of extracellular components. *Microbiology* 144: 1989-1999.
- **Burssens S., de Almeida Engler J., Beeckman T., Richard C., Shaul O., Ferreira P., Van Montagu M. and Inze D. 2000.** Developmental expression of the *Arabidopsis thaliana* *CycA2; 1* gene. *Planta* 211: 623-631.
- **Cederholm H.M., Iyer-Pascuzzi A.S. and Benfey P.N. 2012.** Patterning the primary root in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 7: 237-247.
- **Chao Q., Rothenberg M., Solano R., Roman G., Terzaghi W. and Ecker J.R. 1997.** Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE INSENSITIVE 3 and related proteins. *Cell* 89: 1133-1144.
- **Cho M. and Cho H.T. 2013.** The function of ABCB transporters in auxin transport. *Plant Signal. Behav.* 21: 1-47.
- **Cho H.T. and Cosgrove D.J. 2002.** Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 3237-3253.
- **Chow B. and McCourt P. 2006.** Plant hormone receptors: perception is everything. *Genes Dev.* 15: 1998-2008.
- **Clark K.L., Larsen P.B., Wang X. and Chang C. 1998.** Association of the *Arabidopsis* CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 5401-5406.
- **Chowdhury P.S., Hartman A., Gao X. and Borris R. 2015.** Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42-a review. *Front. Microbiol.* 6: 1-11.
- **Colón-Carmona A., You R., Haimovitch-Gal T. and Doerner P. 1999.** Technical advance: spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J.* 20: 503-508.
- **Contesto C., Milesi S., Mantelin S., Zancarini A., Desbrosses G., Varoquaux F., Bellini C., Kowalczyk M. and Touraine B. 2010.** The auxin-signaling pathway is required for the lateral root response of *Arabidopsis* to the rhizobacterium *Phyllobacterium brassicacearum*. *Planta* 232: 1455-1470.
- **Dharmasiri N., Dharmasiri S. and Estelle M. 2005.** The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 441-445.
- **Díaz-Zorita M. and Fernandez-Canigia M.V. 2009.** Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dry land wheat productivity. *J. Soil Biol.* 45: 3-11.

- **Dobbelaere S., Vanderleyden J. and Okon Y. 2003.** Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *J. Crit Rev. Plant Sci.* 22: 107–149.
- **Esquivel-Cote R., Gavilanes-Ruiz M., Cruz-Ortega R. y Huante P. 2013.** Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en rizobacterias, una revisión. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36: 251-258.
- **Felten J., Kohler A., Morin E., Bhalerao R.P., Klaus P., Francis M., Franck A.D. and Valerie L. 2009.** The ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* stimulates lateral root formation in *Poplar* and *Arabidopsis* through auxin transport and signaling. *Plant Physiol.* 151: 1991–2005.
- **Ferreira P., Hemerly A., de Almeida Engler J., Bergounioux C., Bursens S., Van Montagu M., Engler G. and Inze D. 1994.** Three discrete classes of *Arabidopsis* cyclins are expressed during different intervals of the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 24: 11313-11317.
- **Friml J., Wiśniewska J., Benková E., Mendgen K. and Palme K. 2002.** Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* 415: 806–809.
- **Fukaki H., Tameda S., Masuda H. and Tasaka M. 2001.** Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the *SOLITARY-ROOT/IAA14* gene of *Arabidopsis*. *Plant J.* 29: 153-168.
- **Galinha C., Hofhuis H., Luijten M., Willemsen V., Blilou I., Heidstra R. and Scheres B. 2007.** PLETHORA proteins a dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development. *Nature* 449: 1053-1057
- **Gamalero E. and Glick R.B. 2015.** Bacterial modulation of plant ethylene levels. *Plant Physiol.* 169: 13-22.
- **Garnica-Vergara A. Barrera-Ortiz S., Muñoz-Parra E., Raya-González J., Méndez-Bravo A., Macias-Rodríguez L., Ruiz-Herrera L.F. and López-Bucio J. 2016.** The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ETHYLENE INSENSITIVE 2 functioning. *New Phytol.* 209: 1496–1512.
- **Glick B.R, 2014.** Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Res.* 169: 30-39.
- **Gray N.S., Wodicka L., Thunnissen A.M., Norman T.C., Kwon S., Espinoza F.H., Morgan D.O., Barnes G., Leclerc S., Meijer 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.
- **Gutierrez-Mañero F.J., Ramos-Solano B., Probanza A., Mehouchi J., Tadeo F.R. and Talon M. 2011.** The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol. Plant.* 111: 206-211.

- **Hamed J. and Mohammadipanah F. 2015.** Biotechnological application and taxonomical distribution of plant growth promoting actinobacteria. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 42: 157-171.
- **Hemerly A. S., Ferreira P., de Almeida Engler J., Van Montagu M., Engler G. and Inze D. 1993.** Expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *Plant Cell* 12: 1711-1723.
- **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. Bertana G. Doussan C. Merchan F. and Crespi M. 2009.** Plant root growth, architecture and function. *Plant Soil* 321: 153-187.
- **Hua J. and Meyerowitz E.M. 1998.** Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 94: 261-271.
- **Hungria M., Campos R.J., Souza E.M. and Pedrosa F.O. 2010.** Inoculation with selected strain of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil* 331: 413-425.
- **Ivanchenko M.G., Muday G.K. and Dubrovsky J.G. 2008.** Ethylene–auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 55: 335–347.
- **Janelle K.H. Jung J. and McCouch S. 2013.** Getting to the roots of it: genetic and hormonal control of root architecture. *Front. Plant Sci.* 4: 1-32.
- **Jefferson R.A., Kavanagh T.A. and Bevan M.W. 1987.** GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907.
- **Ju C., Yoon G.M., Shemansky J.M., Lin D.Y., Ying Z.I., Chang J., Garrett W.M., Kessenbrock M., Groth G., Tucker M.L., Cooper B., Kieber J.J. and Chang C. 2012.** CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109: 19486-19491.
- **Kalve S., De Vos D. and Beemster T.S. 2014.** Leaf development: a cellular perspective. *Front. Plant Sci.* 5: 1-25.
- **Kang J., Park H., Burla B., Kretzschmar T., Lee Y. and Martinoia E. 2011.** Plant ABC transporters. *Plant Cell Rep.* 29: 643-650.
- **Kende H. and Zeevaart J.A.D. 1997.** The five classical plant hormones. *Plant Cell* 9: 1197-1210.
- **Khamna S., Yokota A., Peberdy J.F. and Lumyong S. 2010.** Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. *J. BioSci.* 4: 23-32.
- **Kieber J.J. and Haberer G. 2002.** Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. *Plant Physiol.* 128: 354-62.

- **Korasick A.D., Enders A.T. and Strader C. 2013.** Auxin biosynthesis and storage forms. *J. Exp. Bot.* 64: 2541-2555.
- **Lambrecht M., Okon Y., Broek A.V and Vanderleyden J. 2000.** Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria–plant interactions. *Trends Microbiol.* 8: 298-300.
- **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.
- **Laskowski M. and Ten Tusscher K.H. 2017.** Periodic lateral root priming: what makes it tick? *Plant Cell* 29: 432-444.
- **Lewis D.R., Negi S., Sukumar P. and Muday G.K. 2011.** Ethylene inhibits lateral root development, increases IAA transport and expression of PIN3 and PIN7 auxin efflux carriers. *Development* 138: 3485-3495.
- **Liu C.W., Sung Y., Chen B.C. and Lai H.Y. 2014.** Effect of nitrogen fertilizers on the growth and nitrate content of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Int. J. Environ. Res. Public Health* 11: 4427-4440.
- **Ljung K., Bhalerao R.P. and Sandberg G. 2001.** Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *J. Exp. Bot.* 62: 1757-1773.
- **Ljung K. Hull A.K., Celenza J., Yamada M., Estelle M., Normanly J. and Sandberg G. 2005.** Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 17: 1090-1104.
- **Lincoln C., Britton J.H. and Estelle M. 1990.** Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2: 1071-1080.
- **López-Bucio J., Cruz-Ramírez A. and Herrera-Estrella L. 2003.** The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 280–287.
- **López Bucio J., Cruz Ramírez A., Pérez Torres A., Ramírez Pimentel J.G. and Sánchez S. 2009.** Novel signals for plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 523-529.
- **Lugtenberg B. and Kamilova F. 2009.** Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 541-556.
- **Malamy J.E. and Benfey P.N. 1997.** Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124: 33-36.
- **Ma Q. and Robert S. 2013.** Auxin biology revealed by small molecules. *Physiol. Plant.* 151: 25-42.
- **Mansfield S.G. and Briarty L.G. 1991.** Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. II. The developing embryo. *Can. J. Bot.* 69: 461-476.

- **Martinoia E., Grill E., Tommasini R., Kreuz K. and Amrhein N. 1993.** ATP dependent glutathione S-conjugate export pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* 364: 247-249.
- **McNear Jr. D.H. 2013.** The rizosphere-roots, soil and everything between. *Nature Education Knowledge* 4(3):1
- **Meinke D.W., Cherry J.M., Dean C., Rounsley S.D. and Koornneef M. 2015.** *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* 5389: 679-682.
- **Méndez-Bravo A., Raya-González J., Herrera-Estrella L. and López-Bucio J. 2010.** Nitric oxide is involved in alkamide-induced lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 51: 1612–1626.
- **Moubayidin L., Di Mambro R. and Sabatini S. 2009.** Cytokinin–auxin crosstalk. *Trends Plant Sci.*14: 557-562.
- **Müller B. and Sheen J. 2007.** Advances in cytokinin signaling. *Science* 318: 68-69.
- **Murashige T. and Skoog F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- **Nagashima A., Uehara Y. and Sakai T. 2008.** The ABC subfamily B auxin transporter AtABCB19 in involved in the inhibitory effects of N-Naphthylphthalamic acid in the phototropic and gravitropic responses of *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant Cell Physiol.* 49: 1250-1255.
- **Noh B., Bandyopadhyay A., Peer W.A., Spalding E.P. and Murphy A.S. 2003.** Enhanced gravi- and phototropism in plant *mdr* mutants mislocalizing the auxin efflux protein PIN1. *Nature* 423: 999-1002.
- **Pacifici E., Polverari L. and Sabatini S. 2015.** Plant hormone cross talk: the pivot of root growth. *J. Exp. Bot.* 66: 1113-1121.
- **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.
- **Panoli A., Martin M.V., Alandete S.M., Simon M., Neff C., Swarup R. and Bellido A.V. 2015.** Auxin import and local auxin biosynthesis are required for mitotic divisions, cell expansion and cell specification during female gametophyte development in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 10: 1-23.
- **Parry G., Calderon-Villalobos L.I., Prigge M., Peret B., Dharmasiri S., Itoh H., Lechner E., Gray W.M., Bennett M. and Estelle M. 2009.** Complex regulation of the TIR1/AFB family of auxin receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106: 22540-22545.
- **Patriquin D.G., Döbereiner J. and Jain D.K. 1983.** Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. *Plant Biol.* 29: 900-915.
- **Peret B., Larrieu A. and Bennett M.J. 2009.** Lateral root emergence: a difficult birth. *Trends Plant Sci.* 60: 3637-3643.
- **Pickett F.B., Wilson A.K. and Estelle M. 1990.** The aux1 mutation of *Arabidopsis* confers both auxin and ethylene resistance. *Plant Physiol.* 94: 1462-1466.

- **Potuschak T., Lechner E., Parmentier Y., Yanagisawa S., Grava S., Koncz C. and Genschik P. 2003.** EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two *Arabidopsis* F-Box proteins: EBF1 and EBF2. *Cell* 115: 679-689.
- **Qiao H., Shen Z., Huang S.C., Schmitz R.J., Urich M.A., Briggs S P. and Ecker J.R. 2012.** Processing and subcellular trafficking of ER-tethered EIN2 control response to ethylene gas. *Science* 338: 390-393.
- **Rangel de Souza A.D., de Souza S.A., de Oliveira M.V., Ferraz T.M., Figueiredo F.A., da Silva N.D., Rangel P.L., Panisset C.S. and Olivares F.L. 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.
- **Robert H.S. and Friml J. 2009.** Auxin and other signals on the move in plants. *Nat. Chem. Biol.* 5: 325-332.
- **Ruzicka K., Simaskova M., Duclercq J., Petrásek J., Zazimalová E., Simon S., Friml J., Van Montagu M.C. and Benkova E. 2009.** Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106: 4284-4289.
- **Saini S., Sharma I., Kaur N. and Pati K.P. 2013.** Auxin: a master regulator in plant root development. *Plant Cell* 32: 741-757.
- **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.
- **Schwartz A.R., Ortiz I., Maymon M., Herbold C.W., Fujishige N.A., Vijanderan J.A., Villella W., Hanamoto K., Diener A., Sanders E.R, DeMason D.A. and Hirsch A.M. 2013.** *Bacillus simplex*-A little PGPB with anti-fungal activity-alters pea legume root architecture and nodule morphology when co-inoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Agronomy* 3: 595-620.
- **Simon S., Kubes M., Baster P., Robert S., Dobrev P.I., Friml J., Petrasek J. and E. 2013.** Defining the selectivity of processes along the auxin response chain: a study using auxin analogues. *New Phytol.* 200: 1034-1048,
- **Solano R., Stepanova A., Chao Q. and Ecker J.R. 1998.** Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE 3 and ETHYLENE-RESPONSE FACTOR 1. *Genes Dev.* 12: 3703-3714.
- **Somers E., Ptacek D., Gysegom P., Srinivasan M. and Vanderleyden J. 2005.** *Azospirillum brasilense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1803-1810.
- **Spaepen S., Vanderleyden J. and Okon Y. 2009.** Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. *Plant Soil* 51: 283-320.

- **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.
- **Srivastava H., Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Van Onckelen H. and Schumling T. 2002.** Cytokinin deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* 15: 2532-2550.
- **Strader L.C. and Zhao Y. 2016.** Auxin perception and downstream events. *Curr. Opin. Plant Biol.* 33: 8-14.
- **Steenackers E., Kamper M. and Li C. 1994.** Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiol. Res.* 149: 55-60.
- **Steenackers W., Klíma P., Quareshy M., Cesarino I., Kumpf R.P., Corneillie S., Araújo P., Viaene T., Goeminne G., Nowack M.K., Ljung K., Friml J., Blakeslee J.J., Novák O., Zazimalová E., Napier R., Wout B. and Vanholme B. 2017.** Cis-cinnamic acid is a novel, natural auxin efflux inhibitor that promotes lateral root formation. *Plant Physiol.* 173: 552–565.
- **Strzelczyk E., Kampert M. and Li C.Y. 1994.** Cytokinin-like substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiol. Res.* 149: 55-60.
- **Tanaka H., Kitakura S., Rakusova H., Uemura T., Feraru M.I., De Rycke R., Tatsuo S., Kakimoto T. and Friml J. 2013.** Cell polarity and patterning by PIN trafficking through early endosomal compartments in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS Genetics* 9: 1-10.
- **Tilak K. and Annapurna K. 1993.** Role of *Azospirillum* in the improvement of crop production and plant nutrition. *Proc. Ind.Nat.Acad.Sci.* 59:315-324
- **To J.P.C., Deruère J., Maxwell B.B., Morris V.F., Hutchison C.E., Ferreira F.J., Schaller G.E. and Kiebera J.J. 2007.** Cytokinin regulates type-A *Arabidopsis* response regulator activity and protein stability via two-component phosphorelay. *Plant Cell* 19: 3901-3914.
- **Tromas A. and Perrot-Rechenmann C. 2010.** Recent progress in auxin biology. *Trends Plant Sci.* 15: 436-446.
- **Ulmasov T., Murfett J., Hagen G. and Guilfoyle T.J. 1997.** Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9: 1963-1971.
- **Vanneste S. and Friml J. 2009.** Auxin: A trigger for change in plant development. *Plant Cell* 136: 1005-1016.
- **Vanstraelen M. and Benková E. 2012.** Hormonal interactions in the regulation of plant development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28: 463-487.

- **Vadassery J., Ritter C., Venus Y., Camehl I., Varma A., Shahollari B., Novák O., Strnad M., Ludwig-Müller J. and Oelmüller R. 2008.** The role of auxins and cytokinins in the mutualistic interaction between *Arabidopsis* and *Piriformospora indica*. *Mol. Plant Microb. Interact.* 21: 1371-1383.
- **Verbon E.H. and Liberman L.M. 2016.** Beneficial microbes affect endogenous mechanisms controlling root development. *Trends Plant Sci.* 20: 1-12.
- **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. *Plant Soil* 337: 469-480.
- **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.
- **Wang R. and Estelle M. 2014.** Diversity and specificity: auxin perception and signaling through the TIR1/AFB pathway. *Curr. Opin. Plant Biol.* 21: 51-58.
- **Wang Y.H. and Irving H.R. 2011.** Developing a model of plant hormone interactions. *Plant Signal. Behav.* 6: 495-500.
- **Weigel D. and Glazebrook J. 2002.** *Arabidopsis: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- **Whipps J.M. 2001.** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52: 487-511.
- **Wilson Z.A. 2000.** *Arabidopsis: A Practical Approach.* Oxford University Press, New York, pp 1–28.
- **Wilmoth J.C., Wang S., Tiwari S.B., Joshi A.D., Hagen G., Guilfoyle T.J., Alonso J. M., Ecker J.R. and Reed J.W. 2005.** NPH4/ARF7 and ARF19 promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation. *Plant J.* 43: 118-130.
- **Xu M.-J., Dong J.-F. and Zhu M.-Y. 2005.** Nitric oxide mediates the fungal elicitor-induced hypericin production of *Hypericum perforatum* cell suspension cultures through a jasmonic-acid-dependent signal pathway. *Plant Physiol.* 139: 991-998.
- **Zamioudis Ch., Mastranesti P., Dhonukshe P., Blilou I. and Pietersen C.M.J. 2013.** Unraveling root developmental programs initiated by beneficial *Pseudomonas* spp. bacteria. *Plant Physiol.* 162: 304–318
- **Zhao Q. and Guo H.W. 2011.** Paradigms and paradox in the ethylene signaling pathway and interaction network. *Trends Plant Sci.* 4: 626-634.