Ciencia Nicolaita 91: 136-147; Agosto de 2024 doi:10.35830/cn.vi91.805

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

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

Alma Alejandra Hernández Esquivel[1], Jorge Alejandro Torres Olmos[1], Marisol Bernal Avilés[1], Manuel Méndez Gómez[2], Elda Castro Mercado[1], Cesar Arturo Peña Uribe[1], Homero Reyes de la Cruz[1], Ernesto García Pineda[1]*

[1] Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, Edif. B1 CP 58040, Morelia, Michoacán, México
[2] CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato. C.P. 36821, Irapuato, Gto. México

Historial
Manuscrito recibido: 4 de junio de 2024
Manuscrito aceptado: 22 de agosto de 2024
Manuscrito publicado: agosto 2024

***Autor para correspondencia**
Ernesto García Pineda
e-mail: egpineda@umich.mx
ORCID: 0000-0002-4739-7741

Resumen

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

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

Abstract

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

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

Introducción

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

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

Copyright © Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo • ISSN 2007-7068

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

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

La cinasa Target of Rapamycin (TOR) es un regulador central del crecimiento y la proliferación celular en las plantas, participa en la coordinación de respuestas fisiológicas y metabólicas frente a señales ambientales y nutricionales. TOR regula la actividad de diversos factores de transcripción y proteínas cinasas implicadas en la adaptación a cambios en el ambiente, e interacciona con el peróxido de hidrógeno en el control del metabolismo celular (Crespo *et al*., 2005). Dicha relación aún está siendo investigada, pero se plantea que la señalización entre ambos converge en la modulación del crecimiento y la tolerancia al estrés. En este trabajo se analizó el efecto del ácido ascórbico sobre la vía metabólica de TOR y su regulación por peróxido de hidrógeno en *Arabidopsis thaliana* en respuesta a la inoculación con *Azospirillum baldaniorum* Sp245.

Materiales y métodos

Material biológico

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

Preparación de inóculo de Sp245

Se partió de un volumen de 50 mL de medio mínimo LB (Luria-Bertani) (peptona, 10 g/L; extracto de levadura, 5 g/L; NaCl, 5 g/L; $MgSO_4$, 0.186 g/L $CaCl_2$, 0.2775 g/L; pH 7.0), al que se le adicionaron 150 µL de un pre-inóculo con una densidad óptica a 600 nm de 0.900. El cultivo se creció durante 16 horas. Un mL del cultivo bacteriano se centrifugó a 3,893 g durante 5 min a temperatura ambiente (Eppendorf 5415D), y se eliminó el sobrenadante, y la pastilla de bacterias se resuspendió en 1 mL de NaCl al 0.85%, se agitó en vortex y se centrifugó nuevamente a 3,893 g durante 5 min. Se eliminó

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

Tratamiento de *Arabidopsis* con Sp245

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

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

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

Cuantificación de ácido ascórbico

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

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

Análisis de proteínas reporteras

La actividad de la proteína reportera GUS, presente en las líneas transgénicas CYCB1;1::GUS y TOR::GUS se analizó de acuerdo al protocolo reportado por Malamy y Benfey, 1997**.** Las muestras se montaron en portaobjetos y cubreobjetos para analizarlas bajo microscopía de campo claro.

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

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

Análisis de la función y actividad de TOR

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

Análisis estadístico

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

Resultados

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

Se analizó el efecto de Sp245 sobre las plántulas de *Arabidopsis* 6 días después de la inoculación. La morfología de las plántulas se modificó en respuesta a la inoculación (**Fig. 1a**), la longitud de la raíz primaria disminuyó (**Fig. 1b**), y el número de raíces laterales se incrementó (**Fig. 1c**). Aunque en esta etapa no se observó un cambio importante sobre la biomasa en las plantas inoculadas, se apreció un incremento en el tamaño del follaje (**Fig. 1a**, **d**). Por otra parte, se redujo el número de células que

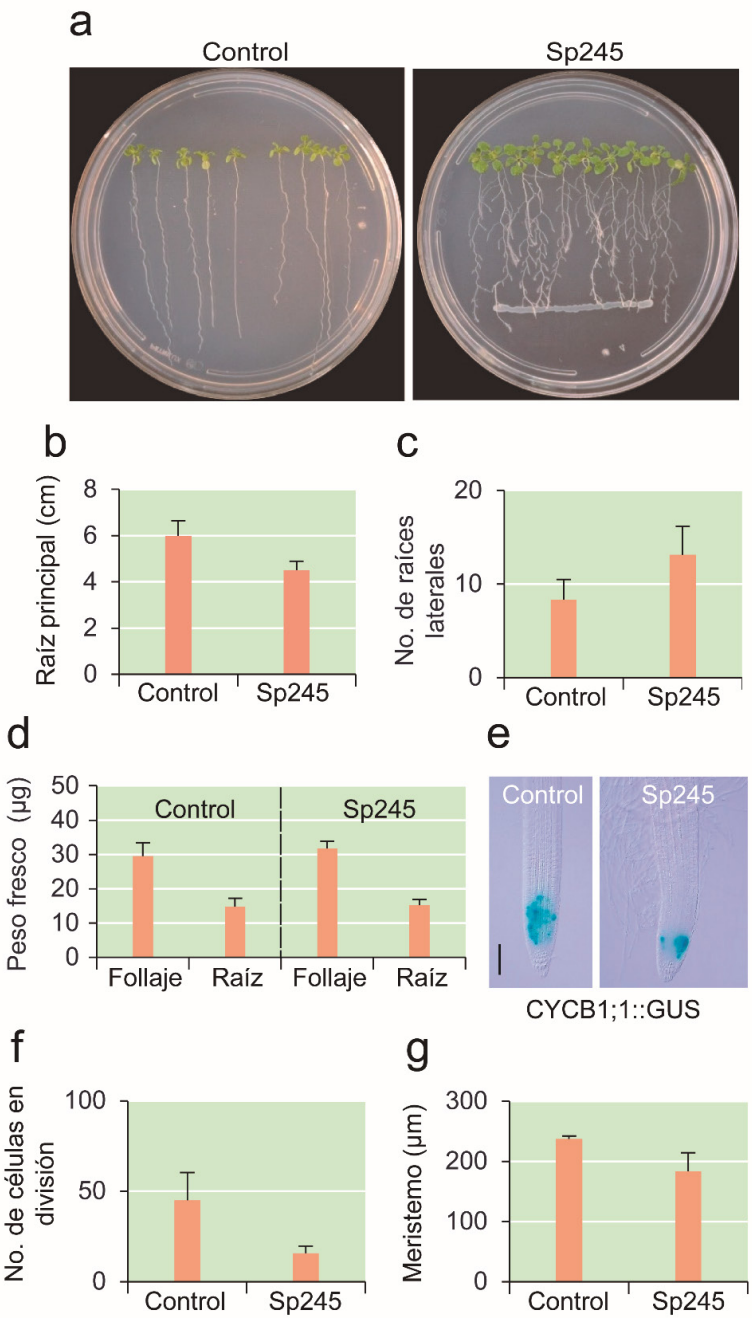

Figura 1. Efecto de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 sobre *Arabidopsis thaliana*. Las plantas fueron inoculadas con Sp245, se crecieron durante 6 días y se analizaron los parámetros de crecimiento. **a**) Imagen de las plantas inoculadas y no inoculadas. **b**, **c**) Análisis de parámetros de la raíz.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

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

Efecto del ácido ascórbico sobre el crecimiento de *Arabidopsis*

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

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

Efecto del ácido ascórbico sobre la expresión de TOR

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

Los resultados anteriores sugieren que la influencia de ácido ascórbico sobre TOR podría tener una función relevante en la modulación de la morfología de *Arabidopsis*. Para analizar esta posibilidad, se utilizó la línea *tor-es*, en la que se inhibe de la expresión de TOR con la aplicación de estradiol. Se inocularon plántulas de *Arabidopsis* con Sp245 en ausencia y en presencia de estradiol y se observó que el estradiol inhibe marcadamente el crecimiento y el desarrollo de las plántulas (**Fig. 3d**). La longitud de la raíz principal se inhibió aproximadamente 70 % y en número de raíces laterales en un 100 % (**Fig. 3e, f**), con lo que TOR podría estar modulando la respuesta de bioestimulación a Sp245.

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

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

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

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

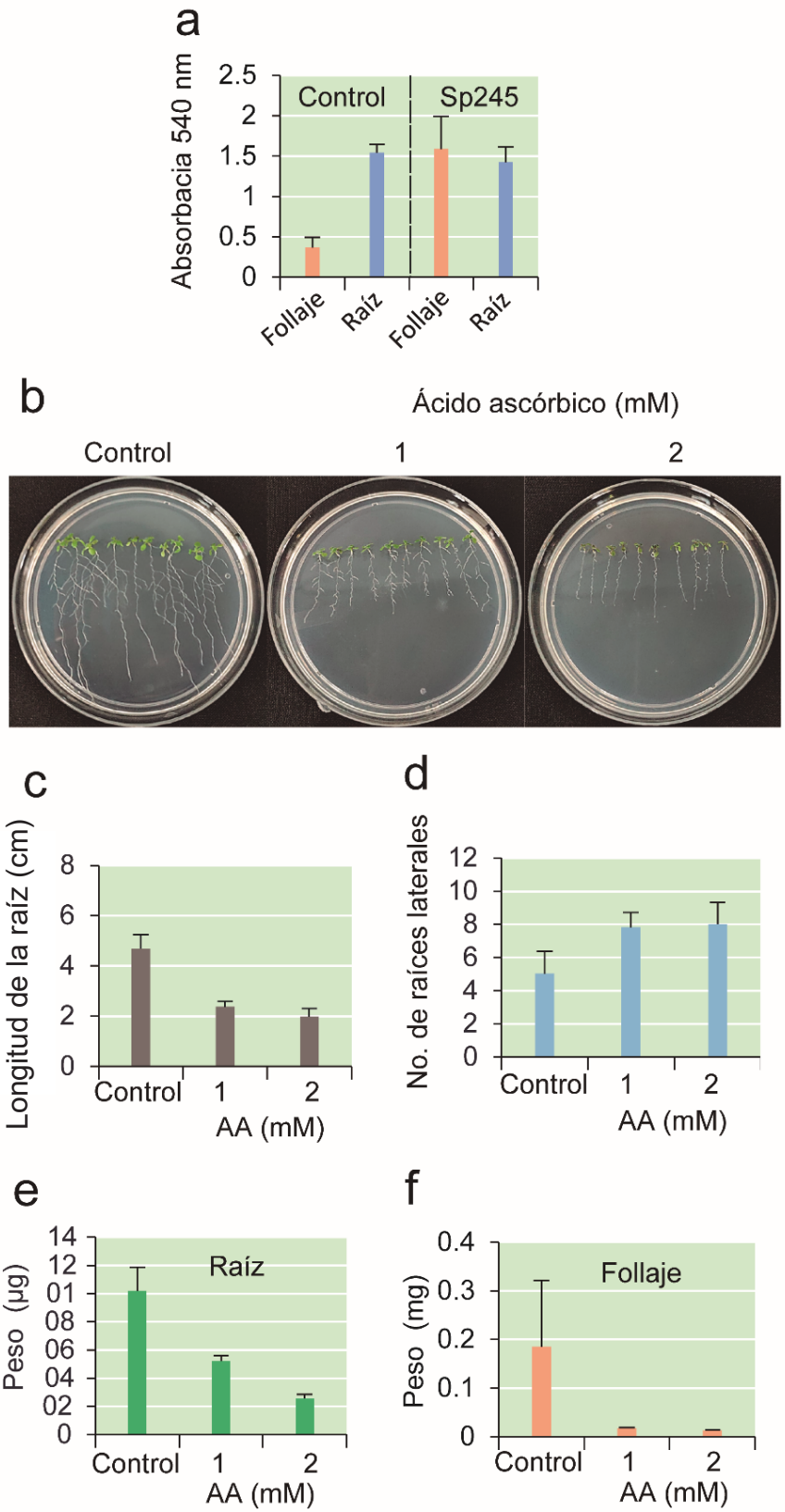

Figura 2. Acumulación de ácido ascórbico y su efecto sobre el crecimiento de *Arabidopsis*. **a**) Acumulación de ácido ascórbico en follaje y raíz. **b**) Imágenes de plantas tratadas con diferentes concentraciones de ácido ascórbico. **c-f**) Parámetros del crecimiento de plantas tratadas con AA. AA=ácido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

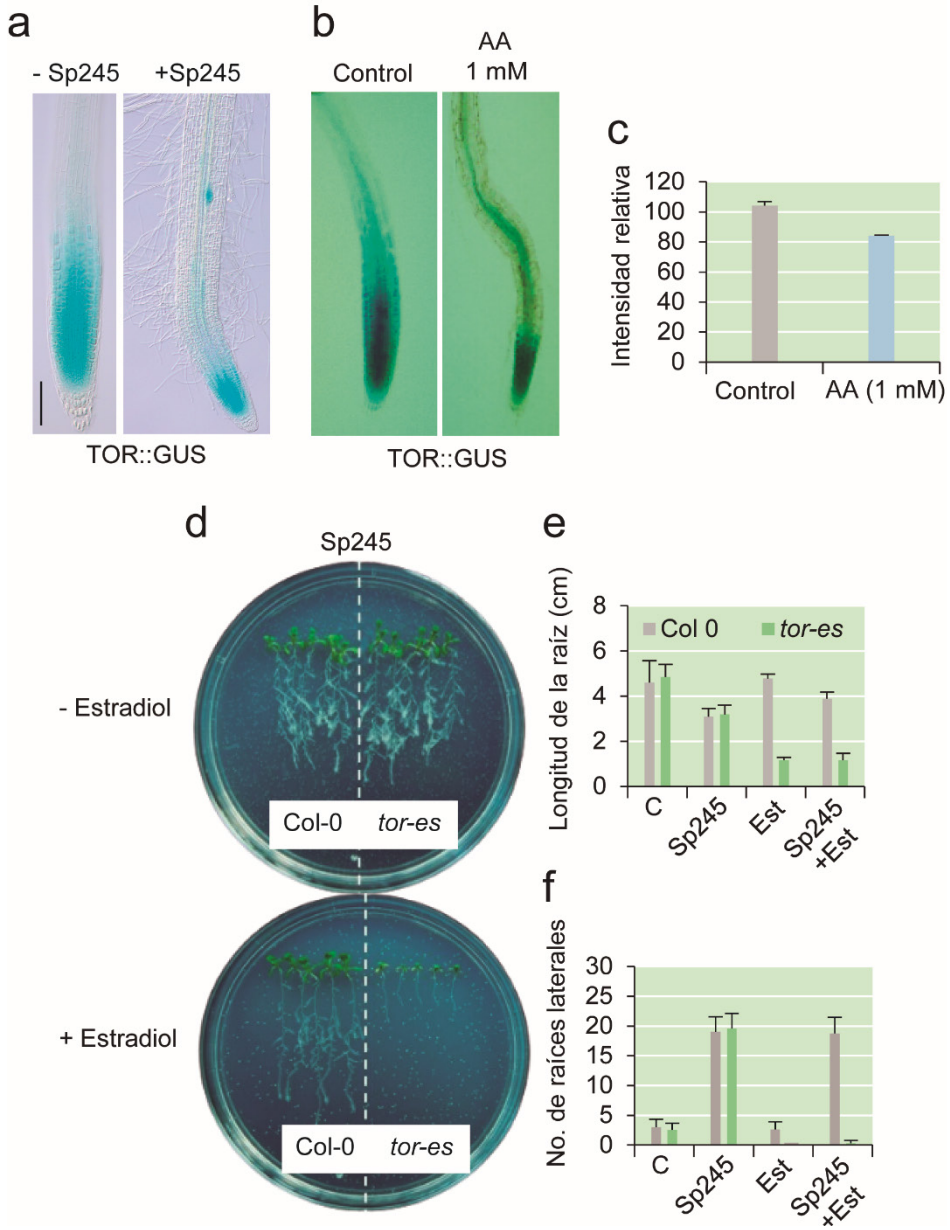

Figura 3. Efecto del ácido ascórbico sobre la expresión de TOR en *Arabidopsis*. **a)** Expresión del reportero TOR::GUS en el meristemo de la raíz principal de plantas inoculadas con Sp245 (**a**), o tratadas con ácido ascórbico (**b**, **c**). **d**) Imágenes de plantas silvestres y mutantes *tor-es*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

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

También se analizó la actividad de TOR por medio de la fosforilación de la proteína S6K, la cual es un blanco directo de su actividad. Los resultados mostraron una inhibición de la fosforilación de S6K dependiente de la concentración de peróxido de hidrógeno utilizada (**Fig. 5e**). Además, las dos concentraciones de peróxido de hidrógeno inhibieron el crecimiento de la planta, así como el de los pelos radiculares (**Fig. 5f**). Estos resultados sugieren que el ácido ascórbico podría modificar el crecimiento de *Arabidopsis* modulando la producción o la acumulación de peróxido de hidrógeno.

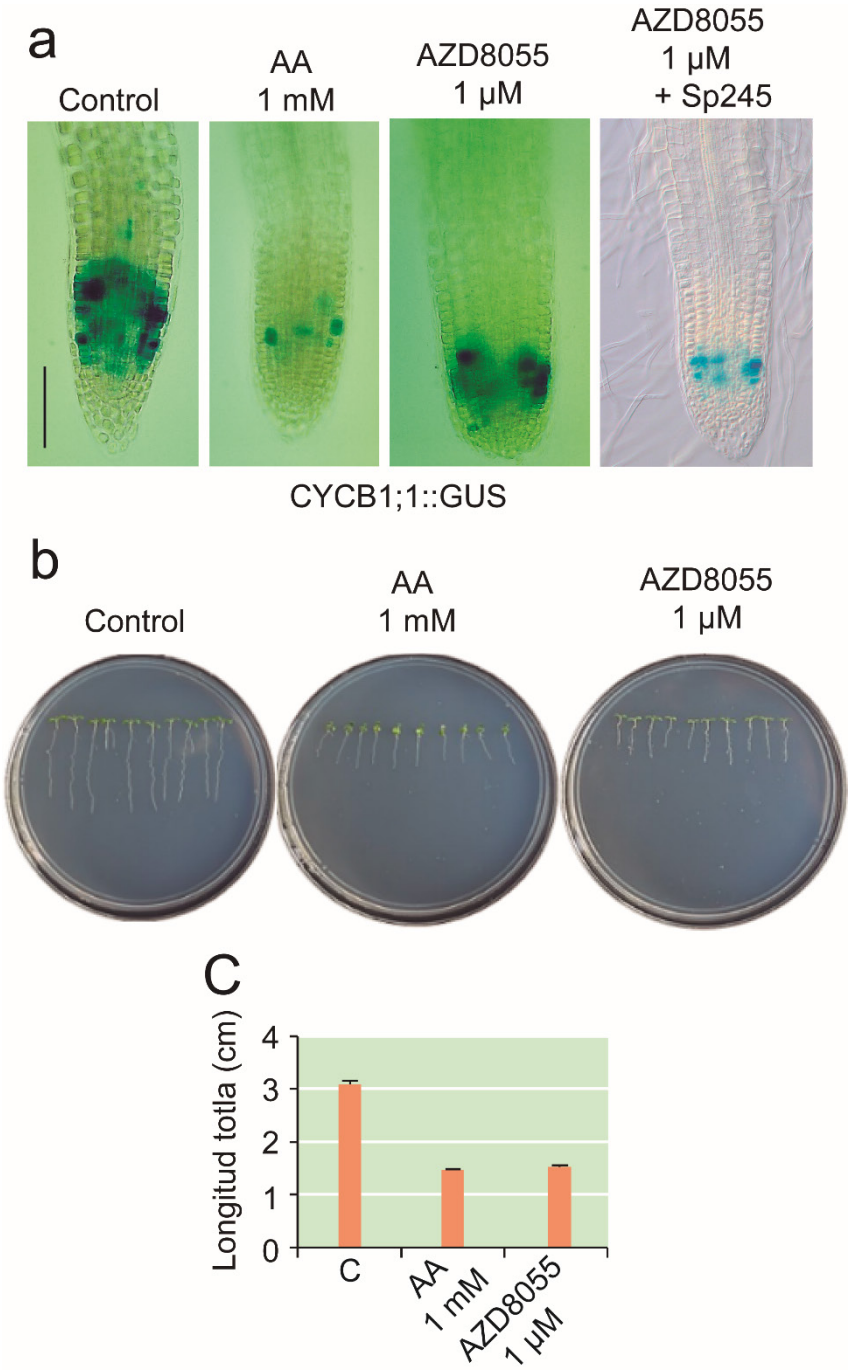

Figura 4. Efecto del ácido ascórbico y de la inhibición de TOR por AZD8055 sobre la división celular y el crecimiento de la raíz. **a**) Expresión del reportero de división celular CYCB1;1::GUS en el meristemo de la raíz principal. (**b**, **c**) Imágenes de plantas crecidas in vitro y longitud total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

Discusión

El ácido ascórbico es el compuesto antioxidante más abundante, esencial para diversas funciones biológicas en las plantas (Chaturvedi *et al*., 2022), y desempeña un papel importante en la división y expansión celular (Zheng *et al*., 2022). Sin embargo, no se ha analizado su función para la bioestimulación por rizobacterias.

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

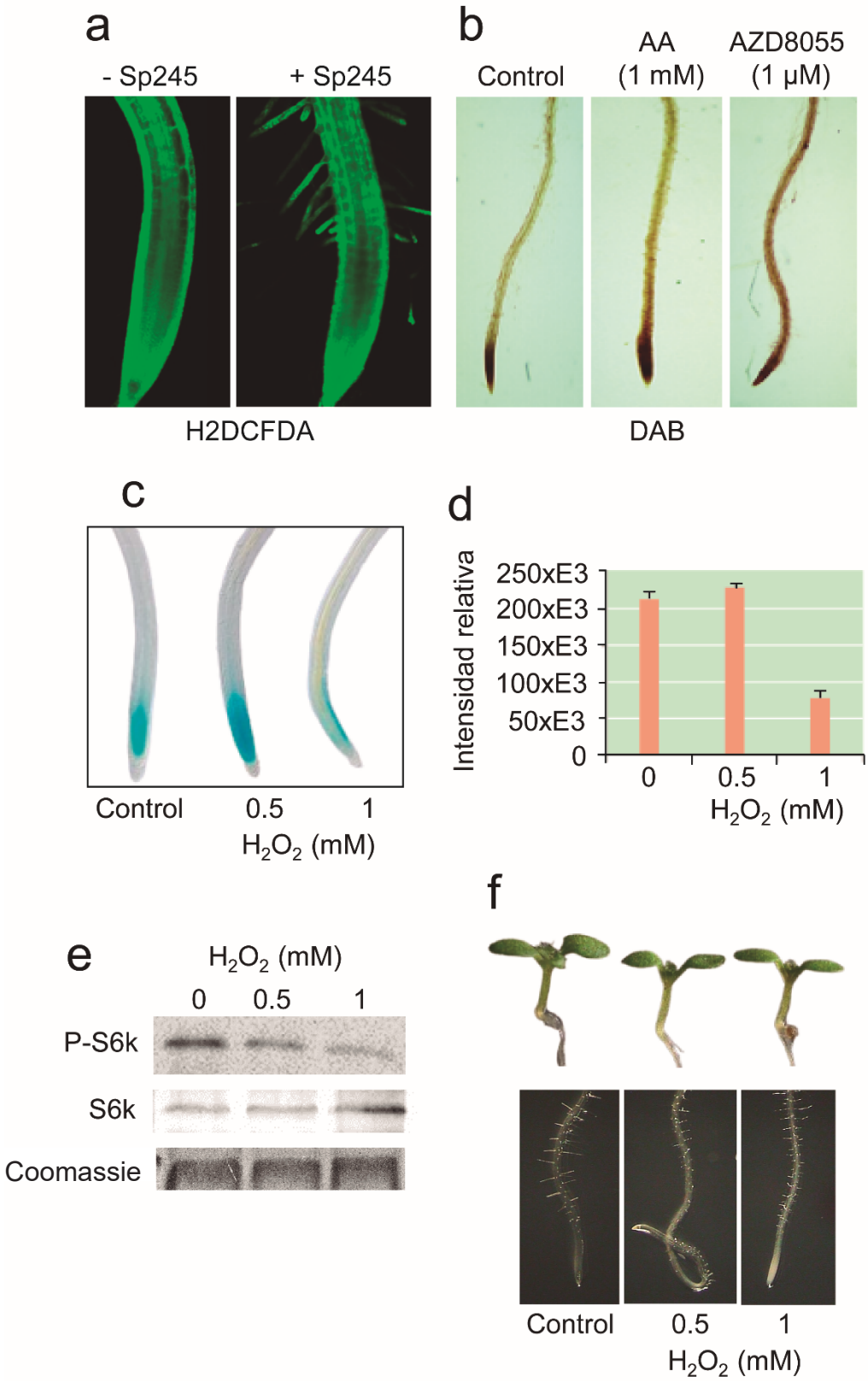

Figura 5. Producción y efecto de peróxido de hidrógeno sobre la expresión y actividad de TOR en la raíz. **a**, **b**) Análisis de acumulación de peróxido de hidrógeno por tinción del tejido con H2DCFDA y DAB. (**c**, **d**) Expresión del reportero TOR::GUS en el meristemo de la raíz principal. **e**)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

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

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

La ruta metabólica de TOR modula la división celular regulando la transición G1/S del ciclo celular (Ahmad *et al*., 2019). Así, para estudiar con más detalle el efecto del ácido ascórbico sobre esta ruta, se analizó la expresión de la ciclina B1;1 en respuesta al tratamiento con esta molécula. El ácido ascórbico disminuyó la expresión de la ciclina notablemente. Además, esta disminución fue observada en el tratamiento con el inhibidor de TOR AZD8055. Estos resultados fueron consistentes con una disminución en el crecimiento de *Arabidopsis*. Lo anterior sugiere que la disminución en el crecimiento de *Arabidopsis* por ácido acórbico es probablemente debido a la inhibición de la actividad de TOR, que a su vez bloquea la división celular.

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

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

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

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

Referencias

Ahmad Z, Magyar Z, Bögre L, Papdi C (2019). Cell cycle control by the target of rapamycin signalling pathway in plants: *Journal of Experimental Botany* 70:2275-2284. doi:10.1093/jxb/erz140.

Apel K, Hirt H (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, signal transduction: *Annual Review of Plant Biology* 55:373-399. doi:10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701.

Buettner GR, Jurkiewicz BA (1996). Catalytic metals, ascorbate free radicals: combinations to avoid: *Radiation Research* 145:532-541.

Carr AC, Frei B (1999). Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant health effects in humans: *The American Journal of Clinical Nutrition* 69:1086-1107.

Carro L, Torres R, Trujillo ME (2018). *Azospirillum baldaniorum* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a biopurification system on a herbicide-producing plant factory: *Intentional Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 68:1240-1245. doi:10.1099/ijsem.0.002648.

Chaturvedi S, Khan S, Bhunia RK, *et al.* (2022). Metabolic engineering in food crops to enhance ascorbic acid production: crop biofortification perspectives for human health: *Physiological Molecular Biology of Plants* 28:871–884. doi:10.1007/s12298-022-01172-w.

Chatzopoulou F, Sanmartin M, Mellidou I, Pateraki I, Koukounaras A, Tanou G, Kalamaki MS, Veljović-Jovanović S, Antić TC, Kostas S, Tsouvaltzis P, Grume,t R., Kanellis AK (2020). Silencing of ascorbate oxidase results in reduced growth, altered ascorbic acid levels ripening pattern in melon fruit: *Plant Physiology Biochemistry* 156:291-303. doi:10.1016/j.plaphy.2020.08.040.

Claeys H, Van Landeghem S, Dubois M, Maleux K, Inzé D (2014). What is stress? Dose-response effects in commonly used *in vitro* stress assays. *Plant Physiology* 165, 519-527. doi:10.1104/pp.113.234641.

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

Crespo JL, Díaz-Troya S, Florencio FJ (2005**).** Inhibition of target of rapamycin signaling by rapamycin in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: *Plant Physiology* 139:1736-1749. doi:10.1104/pp.105.067744.

Davies SHR., Masten SJ (1991). Spectrophotometric method for ascorbic acid using dichlorophenolindophenol: elimination of the interference due to iron: *Analytica Chimica Acta* 248:225-227. doi:10.1016/S0003-2670(00)80888-0.

Foyer CH, Noctor G (2011). Ascorbate glutathione: the heart of the redox hub: *Plant Physiology* 155:2-18. https://doi.org/10.1104/pp.110.167569.

Gullner G, Komives T, Király L, Schröder P (2018). Glutathione S-transferase enzymes in plant-pathogen interactions: *Frontiers in Plant Science* 9:1836. doi:10.3389/fpls.2018.01836.

Kamran A, Mushtaq M, Arif M, Rashid S (2023). Role of biostimulants (ascorbic acid fulvic acid) to synergize *Rhizobium* activity in pea (*Pisum sativum* L. var. Meteor): *Plant Physiology Biochemistry* 196:668-682. doi:10.1016/j.plaphy.2023.02.018.

Kim YC, Leveau J, McSpadden Gardener BB, Pierson EA, Pierson LS, Ryu CM (2014). The multifactorial basis for plant health promotion by plant-associated bacteria: *Applied Environmental Microbiology* 77:1548-1555. doi:10.1128/AEM.01867-10.

Kumar U, Kaviraj M, Panneerselvam P, Priya H, Chakraborty K, Swain P, Chatterjee SN, Sharma SG, Nayak PK, Nayak AK (2019). Ascorbic acid formulation for survivability diazotrophic efficacy of *Azotobacter chroococcum* Avi2 (MCC 3432) under hydrogen peroxide stress its role in plant-growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.): *Plant Physiology Biochemistry* 139:419-427. doi:10.1016/j.plaphy.2019.04.003.

Li C, Jia H, Chai Y, *et al.* (2018). *Arabidopsis* root growth inhibition by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, but not by naphthaleneacetic acid, depends on ethylene-mediated signaling: *Frontiers in Plant Science* 10:918. doi:10.3389/fpls.2019.00918.

Li X, Ye J, Munir S, Yang T, Chen W, Liu G, Zheng W, Zhang Y (2019). Biosynthetic gene pyramiding leads to ascorbate accumulation with enhanced oxidative stress tolerance in tomato: *International Journal of Molecular Science* 20:1558. doi:10.3390/ijms20071558.

Malamy JE, Benfey PN (1997). Organization cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*: *Development* 124:33-44. doi:10.1242/dev.124.1.33.

MenB, Desnos T, Nussaume L F Berger, Bouchez D, Meyer C, Robaglia C (2002). Expression disruption of the *Arabidopsis* TOR (target of rapamycin) gene: *Proceedings National Academy of Sciences U S. A*. 99:6422–6427.

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004). Reactive oxygen gene network of plants: *Trends in Plant Science* 9:490-498. doi:10.1016/j.tplants.2004.08.009.

Reyes de la Cruz H, Aguilar R, Sanchez de Jimenez E. (2004). Functional characterization of a maize ribosomal S6 protein kinase (ZmS6K), a plant ortholog of metazoan p70(S6K): *Biochemistry* 43:533–539.

Smirnoff N, Wheeler GL (2000). Ascorbic acid in plants: Biosynthesis function: *Critical Reviews in Biochemistry Molecular Biology* 35:291-314. doi:10.1080/10409230008984166.

Thakur N, Flowerika, Chaturvedi S, Tiwari S (2023). Wheat derived glucuronokinase as a potential target for regulating ascorbic acid phytic acid content with increased root length under drought ABA stresses in *Arabidopsis thaliana*: *Plant Science* 331:111671. doi:10.1016/j.plantsci.2023.111671.

Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB (1997). Subcellular localization of H_2O_2 in plants. H_2O_2 accumulation in papillae hypersensitive response during the barley—powdery mildew interaction: *Plant Journal* 11:1187–94

Veljovic-Jovanovic S, Noctor G, Foyer CH (2002). Are leaf hydrogen peroxide concentrations commonly overestimated? The potential influence of artefactual interference by tissue phenolics ascorbate. *Plant Physiology Biochemistry* 40:501-507. doi:10.1016/S0981-9428(02)01313-0.

Xiong Y, Sheen J (2012). Rapamycin glucose-target of rapamycin (TOR) protein signaling in plants: *Journal of Biological Chemistry* 287:2836-42. doi:10.1074/jbc.M111.300749.

Zhang Z, Zhu JY, Roh J, Marchive C, Kim SK, Meyer C, Sun Y, Wang W, Wang ZY (2016). TOR signaling promotes accumulation of BZR1 to balance growth with carbon availability in *Arabidopsis*: *Current Biology* 26:1854-60. doi:10.1016/j.cub.2016.05.005.

Zheng X, Gong M, Zhang Q, Tan H, Li L, Tang Y, Li Z, Peng M, Deng W. (2022). Metabolism regulation of ascorbic acid in fruits: *Plants* 11:1602. doi:10.3390/plants11121602.

Zheng Z, Wang Z, Wang X, Liu D (2019). Blue light-triggered chemical reactions underlie phosphate deficiency-induced inhibition of root elongation of *Arabidopsis* seedlings grown in Petri dishes: *Molecular Plant* 12:1515–1523. doi:10.1016/j.molp.2019.08.001.