



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**Activación de la cascada MAPK por los oligogalacturónidos
(OGs) en *Arabidopsis thaliana***

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

p. Q.F.B JESÚS REYES DE LA CRUZ

ASESORA:

D.C. ELDA MARÍA BELTRÁN PEÑA

Morelia Michoacán, Enero 2012



ÍNDICE GENERAL

	Página
Índice de figuras	i
Índice de tablas	ii
Resumen	1
I. INTRODUCCIÓN	
1.1 Pared celular	2
1.1.1 Pectina	3
1.1.2 Sistema pectinolítico	5
1.2 Respuestas de defensa inducibles en plantas por el ataque de patógenos	5
1.3 Oligogalacturónidos	7
1.3.1 Antecedentes de la acción biológica de los oligogalacturónidos (OGs) ...	8
1.4 Cascada de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) en plantas	11
1.4.1 Funciones de las cinasas MAPK3 y MAPK6 en plantas	12
1.5 Fitoalexinas	14
1.6 <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio	17
1.6.1 Arquitectura de la raíz	17
1.7 Análisis de la expresión génica	19
1.8 Transformación de plantas por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	20
1.8.1 Sobreexpresión de genes	21
1.8.2 Silenciamiento de genes por la técnica de RNA de interferencia (RNAi)	22
1.8.3 Mutagénesis	22
II. JUSTIFICACIÓN	24
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	24
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	
4.1 Estrategia experimental	25
4.2 Semillas	26
4.3 Reactivos	26
4.4 Equipo	26
4.5 Desinfección de semillas	27

4.6	Preparación de medio de cultivo	27
4.7	Condiciones de crecimiento	27
4.8	Extracción y cuantificación del RNA	28
4.9	Extracción de camalexina	29
4.10	Oligonucleótidos	29
4.11	Amplificación de los transcritos por RT-PCR	30
4.12	Análisis densitométrico	31
V.	RESULTADOS	
5.1	Determinación de la expresión del gen <i>AtMAPK6</i> por RT-PCR	32
5.2	Análisis de la arquitectura radicular de las plántulas de sobre-expresión y mutantes de <i>MAPK6</i> en <i>A. thaliana</i>	33
5.3	Efecto de los OGs sobre la arquitectura radicular en líneas de sobre expresión y mutante para el gen <i>AtMAPK6</i>	34
5.4	Efecto de los OGs en las líneas de sobre y baja expresión de <i>AtMAPK3</i> en <i>A. thaliana</i>	36
5.5	Efecto de los OGs sobre la expresión de los transcritos <i>AtMAPK3</i> y <i>AtMAPK6</i> en las diferentes líneas de <i>A. thaliana</i>	38
5.6	5.6 Acumulación de camalexina y expresión de <i>PAD3</i> por efecto de los oligogalacturónidos.	40
VI.	DISCUSIÓN	
6.1	Análisis del sistema radicular de las líneas OvMAPK6 y <i>mapk6</i> de <i>A. thaliana</i>	44
6.2	Efecto de los OGs sobre la arquitectura radicular en Wt, OvMAPK3, RNAiMAPK6, OvMAPK6 y <i>mapk6</i> de <i>A. thaliana</i>	44
6.3	Efecto de los OGs sobre la expresión de los genes <i>MAPK3</i> y <i>MAPK6</i> en plántulas Wt, OvMAPK3, RNAiMAPK3, OvMAPK6 y <i>mapk6</i> de <i>A. thaliana</i>	46
6.4	6.4 Efecto de OGs sobre la acumulación de camalexina en plántulas Wt, RNAiMAPK3, OvMAPk6 y <i>mapk6</i> de <i>A. thaliana</i>	47
VII.	CONCLUSIÓN	49
VIII.	PERSPECTIVAS.....	50
IX.	BIBLIOGRAFÍA	51

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura de la pared celular	3
Figura 2. Esquema estructural de la pectina	4
Figura 3. Degradación de la pared celular por las enzimas liberadas	8
Figura 4. Función básica de la ruta de señalización de las MAPK	11
Figura 5. Funciones de la cascada de señalización MAPK6	13
Figura 6. Biosíntesis de la camalexina	15
Figura 7. Modelo de la participación del factor de transcripción WRKY33 activado por las cinasas MPK3/MPK6, en la regulación de la biosíntesis de camalexina	16
Figura 8. Arquitectura de la raíz principal	19
Figura 9. Estructura del gen <i>AtMAPK6</i>	32
Figura 10. Expresión del gen <i>AtMAPK6</i>	33
Figura 11. Arquitectura radicular de plántulas de <i>A. thaliana</i> Wt, OvMAPK6 y <i>mapk6</i>	34
Figura 12. Arquitectura radicular de plántulas de <i>A. thaliana</i> Wt, <i>mapk6</i> y OvMAPK6 tratadas con 10 ng/ml de OGs	35
Figura 13. Efecto de los oligogalacturónidos sobre el desarrollo de plántulas modificadas en el gen <i>AtMAPK6</i>	36
Figura 14. Efecto de los OGs sobre la arquitectura radicular de plántulas Wt, OvMAPK3 y RNAi MAPK3 de <i>A. thaliana</i>	37
Figura 15. Efecto de los OGs sobre el desarrollo de plántulas <i>A. thaliana</i> que aumentan y disminuyen la expresión de <i>AtMAPK3</i>	37
Figura 16. Expresión de <i>AtMAPK3</i> por efecto de los OGs	39

Figura 17. Expresión de <i>AtMAPK6</i> por efecto de los OGs	40
Figura 18. Curva estándar de camalexina pura	41
Figura 19. Acumulación de camalexina en plantas adultas	42
Figura 20. Nivel de expresión de <i>PAD3</i> en plantas adultas	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividad biológica de los α -1,4-oligogalacturónidos en plantas.....	10
--	----

El presente 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.



Con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 48712) y de la Coordinación de la Investigación Científica (CIC) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.



Tesis apoyada por el Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología del estado de Michoacán.

Dedicatoria

A Dios:

Por darme fuerza y valor de seguir adelante, aun en los momentos más difíciles de mi vida.

A mis padres y hermanos

Por brindarme el apoyo cuando más los he necesitado, así como también por los consejos, la dedicación y el amor que me han dado. A mis padres que han sabido guiarme por el camino correcto de la vida, por enseñarme a valorar mi esfuerzo con lo que he llegado a donde estoy.

A mi novia: Elizabeth Roblero López

Por brindarme su cariño y amor, por su comprensión, consejos y apoyo que me dio durante todo este tiempo.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Mercedes de la Cruz Hernández y Juan Reyes Martínez, por haberme cuidado durante todo este tiempo, por sus valiosos consejos y enseñanzas. Por confiar en mí.

A mis hermanos y hermanas Joel, Juan, Verónica y Mercedes por estar siempre a mi lado y apoyarme en las cosas buenas y malas que he realizado.

A mi asesora de tesis la DC. Elda María Beltrán Peña por todo el apoyo que me ha brindado dentro y fuera del laboratorio, por los conocimientos que me ha proporcionado y por toda la paciencia durante el desarrollo de la tesis.

A la Dra. Mary por la ayuda que me ha brindado, por haberme enseñado a hacerme más responsable con todas las cosas.

A mis sinodales y revisores de tesis por haberme dado su tiempo y comentario para hacer de esta tesis un buen trabajo.

A mis compañeros de laboratorio Rocío, Gris, Mony, Aurelio, Ricardo, Edgar, Ernesto e Israel por hacer más agradable el trabajo en el laboratorio.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por haberme permitido realizar mis estudios, apoyándome con la casa habitación y alimentación durante 5 años.

Resumen

Las plantas a lo largo del ciclo de vida modifican su desarrollo y crecimiento en respuesta a cambios ambientales. El reconocimiento de microorganismos o sustancias que actúan como señales de peligro provocan a nivel bioquímico y fisiológico ajustes importantes en los vegetales. La cascada de las proteínas cinasas activada por mitógenos (MAPK) en plantas es disparada por estreses bióticos y abióticos y consta de tres clases de cinasas que se activan consecutivamente: la triple cinasa (MAPKKK), la doble cinasa (MAPKK) y la cinasa sencilla (MAPK) finalizando con la expresión de genes relacionados a defensa. También se ha reportado que dicha cascada participa en el desarrollo y crecimiento vegetal. Por otra parte los oligogalacturónidos (OGs), son moléculas derivadas de la pared celular de la planta por acción de enzimas provenientes de los microorganismos. Estudios sobre el efecto de los OGs han mostrado que dichos compuestos están involucrados en la producción de fitoalexinas en *Phaseolus vulgaris*, *Arabidopsis thaliana* y perejil, así como en el desarrollo y crecimiento de las plantas estimulando la producción de raíces laterales y la floración. En el presente estudio encontramos que una mezcla de OGs con grado de polimerización de 6 a 13 residuos de ácido galacturónico regula el desarrollo de la arquitectura radicular en plántulas *mapk6* a través de un aumento en la expresión de *AtMAPK3*. En cuanto a la acumulación de la camalexina ambas cinasas MAPK3/MAPK6 parecen estar involucradas en la respuesta a los OGs, debido a que en las líneas RNAiMAPK3 y *mapk6* no se observó el efecto estimulador que se presentó en las plantas silvestres.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Pared celular

Las plantas son organismos expuestos a agentes externos los cuales generan grandes cambios en su estructura a través de mecanismos especializados para responder a estímulos bióticos y abióticos del medio que los rodea. A diferencia de los animales, las plantas carecen de esqueleto y en su lugar poseen paredes fuertes de diversas formas y grosor que realmente son capas de celulosa aglutinada. La pared celular vegetal es un elemento estructural importante que distingue a las células de la planta de otros eucariontes; además de ser una matriz extracelular que interactúa con las proteínas de la superficie celular aportando al organismo información sobre su posición y grado de desarrollo (Cosgrove 1997). Las células vegetales presentan dos tipos de paredes celulares denominadas primaria y secundaria; la primera es variable durante el crecimiento celular y nivela la presión interior de los líquidos, al completarse el crecimiento se vuelve rígida como un esqueleto exterior. Dicha pared está compuesta por una red compleja de polímeros como celulosa y hemicelulosa rodeada por una matriz de polisacáridos pécticos (que representa alrededor del 30%) y glicoproteínas estructurales como las extensinas, expansinas y proteínas extramembranales. Ejemplo de estas últimas, son los complejos de celulosa sintetasa, receptores tipo cinasa y canales iónicos (Fig. 1). Por otro lado, las paredes secundarias que rodean a las células están formadas por fibras y células del xilema de los haces vasculares. Este tipo de pared generalmente presenta menos pectina, más celulosa y una clase diferente de hemicelulosa (β 1-4 xilanos). Como se mencionó anteriormente, la celulosa está presente en los dos tipos de pared vegetal por lo que se ha considerado que es la molécula más abundante en la naturaleza y también ha sido la más ampliamente estudiada. La celulosa está compuesta por monómeros de glucosa unidos por enlaces β 1-4 formando largas cadenas lineales (Pérez-Almeida y Carpita, 2006). Se ha observado que las paredes celulares, particularmente las primarias poseen plasmodesmos los cuales son componentes de señalización y comunicación simplástica (Ramírez-Orduña et al., 2002). Los plasmodesmos son canales que atraviesan la pared uniendo los citoplasmas de células adyacentes y facilitando con ello la comunicación intercelular (Geydan y Melgarejo, 2006). Así, se puede apreciar que la pared celular primaria es una matriz extracelular químicamente dinámica (Ramírez-Orduña et al., 2002).

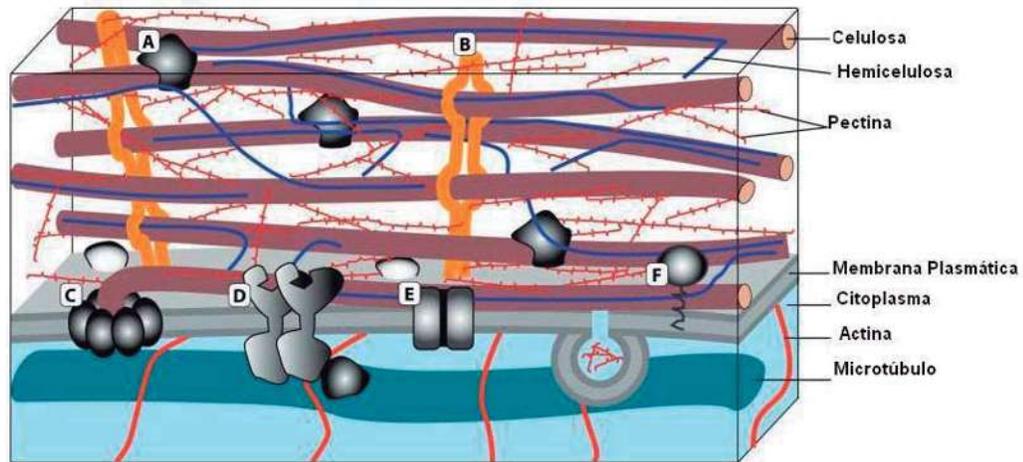


Figura 1. Estructura de la pared celular. La pared está formada por filamentos de celulosa y de hemicelulosa que se entrelazan con una matriz de pectina. Además también contiene proteínas como: expansinas (A), extensinas (B). En la membrana celular existen proteínas que interactúan directamente con la pared: complejo celulosa sintetasa (C), receptores tipo cinasa (D), canales iónicos (E) y proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) (F). Imagen tomada de Humphrey et al., 2007.

1.1.1 Pectina

La pared celular de los vegetales se define como el componente celular que rodea al protoplasto e interactúa con las células vecinas, uniéndolas entre sí para formar los diferentes tipos de tejidos. Una de las moléculas que forman la pared es la pectina, un heteropolisacárido que se encuentra en la mayor parte de los tejidos vegetales; específicamente en los parenquimáticos y meristemáticos. En el tejido celular la zona más rica en pectina corresponde a la pared primaria de la célula y a la lámina media que las separa y su componente principal es el ácido galacturónico unido por enlaces α -1-4 (GalA). Los polisacáridos pécticos constituyen cerca de un tercio de la pared celular de las dicotiledóneas (Carpita y Gibeau, 1993). Desde el punto de vista estructural se conoce que la pectina es un polímero distribuido en bloques de dos tipos: no ramificado y ramificado (Iacomini et al., 2005). El primero está constituido por una cadena lineal de unidades de ácido galacturónico unidas entre sí por enlaces α -(1,4), la cual se conoce como homogalacturonanos (HG), formados por 100-200 residuos de ácido galacturónico. Alrededor del 75% de dichos residuos presentan esterificaciones con grupos metílicos sobre los carboxilos (COO^-) (Cosgrove 2005) (Fig. 2). La disposición espacial más favorable en términos de mínima energía que adoptan los HG es la helicoidal, no obstante la unión de dos cadenas de HG no esterificadas crea estructuras denominadas “caja de huevo” donde la carga negativa de los grupos carboxilos permiten

la unión de iones calcio formando así estructuras importantes para el mantenimiento y la integridad de la pared celular (Willats et al., 2001). El segundo tipo de bloques es el ramificado, una cadena lineal que es interrumpida frecuentemente por unidades de β -L-ramnopiranosido enlazadas en posiciones 1-2 que quiebran la regularidad lineal del esqueleto. Una gran cantidad de estos residuos portan cadenas laterales de azúcares neutros, que dependiendo de su composición se clasifican como ramgalacturonano I (RGI) o ramgalacturonano II (RGII) (Fig. 2) (Morris et al., 1982). Los primeros constituyen el 7% de la pared celular primaria y su pectina presenta un grado de polimerización estimado en 2000 residuos GalA, unidos por enlaces α (1-4) y cuya secuencia de unidades de ácido galacturónico se interrumpe por residuos ramnósidos y posee azúcares neutros adyacentes a la cadena. El segundo (RG II) contribuye con el 3% de la pared celular primaria y constituye una región pequeña de los polisacáridos pécticos formada de 25-50 residuos glicosílicos y por monosacáridos que raramente se observan en otros polímeros como el 2-O-metil-D-xilosa y D-apiosa. El RG II contiene como residuos terminales el ácido galacturónico, D-galactosa, L-arabinosa, L-ramnosa, 2-O-metil-L-fucosa y 2-O-metil-D-xilosa (Aguilar et al., 1999).

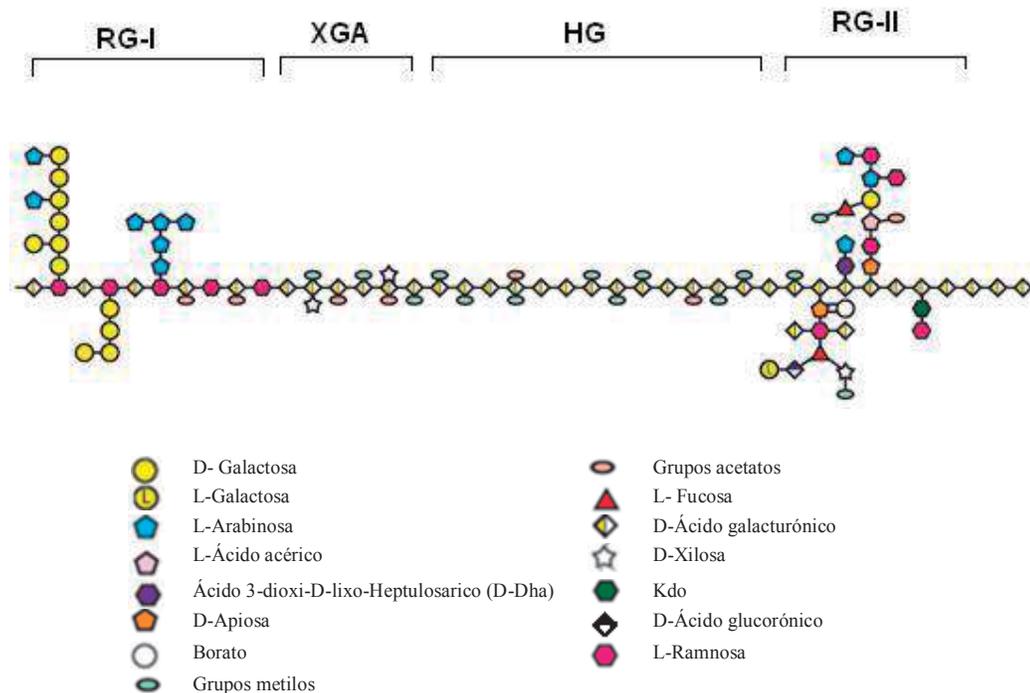


Figura 2. Esquema estructural de la pectina. La pectina está formada por tres polisacáridos principales; en el extremo izquierdo se presenta el ramnogalacturonano I (RG-I), a la derecha el ramnogalacturonano II (RG-II) y un homogalacturonano (HG) central. También encontramos una región de galacturonano la cual posee monómeros de D-xilosa, conocida como xilogalacturonano (XGA) que se muestra entre el HG y el RG-I (Modificada de Burton et al., 2010).

1.1.2 Sistema pectinolítico

El grupo de enzimas encargadas de degradar a la pectina hasta sus azúcares constitutivos se conocen como pectinasas y su clasificación se basa en la parte de la estructura sobre la que actúan: las que degradan la estructura principal de la pectina y el grupo conformado por enzimas accesorias. De acuerdo al mecanismo de acción las primeras se dividen en enzimas desesterificantes y despolarizantes, denominadas pectinacetilesterasas o pectinmetilestereasas debido a que se encargan de liberar los grupos acetilos o metilos presentes a lo largo de la cadena principal. Por otra parte, el grupo de enzimas despolimerizantes se subdivide con base a la reacción que catalizan en: polimetilgalacturonasas, poligalacturonasas, poligalacturonato liasas y polimetilgalacturonato liasas (Kashyap et al., 2001). Las poligalacturonasas catalizan la hidrólisis de los enlaces α -1,4-glicosídicos del ácido poligalacturónico y pueden ser del tipo endo o exo poligalacturonasas. Las enzimas pécticas microbianas son determinantes en la patología vegetal debido a sus funciones desesterificantes y depolimerizantes. Las primeras catalizan la hidrólisis de los ésteres metílicos de los ácidos poligalacturónicos, las enzimas despolimerizantes atacan preferentemente a las zonas lineales de los homogalacturonanos o ramificadas de los ramgalacturonanos (Maderos y Hormaza, 2008).

1.2 Respuestas de defensa inducibles en plantas por el ataque de patógenos

El contacto de la planta con los microorganismos patógenos ha llevado a la primera al desarrollo de sistemas de defensa inducibles que contrarrestan el daño causado por los microorganismos. Las primeras respuestas, una vez que el patógeno ha conseguido penetrar la pared celular involucra a los receptores de patrones de reconocimiento (en inglés PRRs) situados en la superficie extracelular que permiten el reconocimiento de los patrones moleculares que identifican a toda clase de patógenos (Boller y Felix, 2009). El evento antes mencionado se conoce como inmunidad innata y es la primera línea de defensa vegetal inducida contra enfermedades infecciosas. Se considera que los PRRs reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (en inglés PAMPs) (Chisholm et al., 2006) quedando englobados estos últimos en un concepto más amplio denominado patrones moleculares asociados a microbios (en inglés MAMPs) (Boller y Felix, 2009). Este último concepto se propuso después del

descubrimiento de que la planta también es capaz de reconocer de este modo a otros microorganismos no patogénicos. La degradación enzimática de las barreras estructurales que contienen los tejidos de las plantas como la pared celular, libera compuestos que son subproductos de dicha degradación. Estas moléculas, actúan como señales de peligro induciendo la inmunidad innata y se clasifican como patrones moleculares asociados al daño (en inglés DAMPs). El reconocimiento de MAMPs y DAMPs es indispensable para la activación de un tipo de inmunidad denominada PTI o inmunidad activada por PAMPs (en inglés PAMP-triggered immunity) (Boller y Felix, 2009; Jones y Dangl, 2006). Cuando el microorganismo es capaz de superar este tipo de inmunidad, debe enfrentarse a un mecanismo de detección más especializado que se conoce como inmunidad activada por efectores (ETI) (Chisholm et al., 2006; Jones y Dangl, 2006), el cual induce la resistencia basada en genes *R* o resistencia vertical. Tras la percepción del patógeno se activan rápidamente unas series de respuestas de defensas que incluyen el flujo de iones Ca^{2+} , la alcalinización del espacio extracelular, el estallido oxidativo mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y del óxido nítrico (NO), activación de varias cinasas y la expresión de genes asociados a defensa (Nürnberger y Scheel, 2001). Las funciones de estos últimos involucran la biosíntesis de ácido salicílico (SA) y de etileno, el reforzamiento de la pared celular mediante la lignificación, producción de agentes antimicrobianos y un tipo de muerte celular denominada respuesta hipersensible (HR) en el lugar de entrada del patógeno (Dangl y Jones, 2001). Entre la expresión de genes relacionados con defensa, cabe destacar algunas familias génicas que codifican para proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Dempsey y Klessig, 1994). Las primeras PRs se detectaron en experimentos de susceptibilidad en plantas de tabaco al virus del mosaico de tabaco “TMV” (VanLoon y Van Kammen, 1970). También fue posible encontrar una respuesta parecida a la HR tras el reconocimiento de las MAMPs por parte de la planta (Vleeshouwers et al., 2000). Por otra parte, se ha observado que la inoculación con un patógeno activa la muerte celular en hojas distales no inoculadas. Este último efecto se conoce como respuesta de micro hipersensibilidad (Alvarez et al., 1998). La expresión de genes de defensa que precede a la percepción del patógeno también incluye la producción de compuestos fenólicos, algunos con características antimicrobianas como las fitoalexinas (Thomma et al., 1999).

1.3 Oligogalacturónidos

Los oligogalacturónidos (OGs) son compuestos derivados de la degradación de los homogalacturonanos presentes en la pared celular de la planta durante su interacción con microorganismos patógenos (Hernández-Mata et al., 2007). Estos microorganismos al interactuar con la planta liberan enzimas (galacturonasas, xilanasas y glucanasas) que se encargan de degradar a la pared celular liberando fragmentos de polisacáridos. Los oligosacáridos liberados por las glucanasas proporcionan al microorganismo una fuente de carbono y algunos de los fragmentos son percibidos por la planta generando respuestas de defensa, también esta última produce enzimas que degradan a las galacturonasas secretadas por el hongo, así como endo-glucanasas que degrada la pared celular del hongo. Los oligosacáridos liberados de la pared celular de la planta y del hongo (incluyendo a los OGs) son detectados por la planta y desencadenan una cascada de señalización que enciende genes involucrados en la respuesta de defensa (Fig. 3) (Gomathi y Gnanamanickam, 2004). Los OGs están entre las oligosacarinas más estudiadas y su actividad biológica depende de su estructura química y la concentración en el medio celular. Se ha demostrado que los OGs están involucrados en el mecanismo de regulación de diferentes procesos relacionados con el crecimiento, desarrollo, maduración e incluso organogénesis de las plantas (Mauro et al., 2002; Van-Halbeek 1994). Como se mencionó anteriormente, los OGs fueron los primeros oligosacáridos descubiertos y son moléculas lineales constituidas por unidades de ácido D-galacturónico unidas por enlaces α 1-4 (Bishop et al., 1981; Hahn et al., 1981). Según Monsoor (2005) el grado de polimerización de los oligogalacturónidos es el factor estructural más importante en la definición de su función biológica. La mayoría de los estudios de dependencia estructura-actividad evidencian que un grado de polimerización igual a nueve es el tamaño mínimo de los oligómeros biológicamente activos. La respuesta biológica de los OGs se observa tanto en las monocotiledóneas como en las dicotiledóneas (Inngjerdingen et al., 2005; Moerschbacher et al., 1999). Los procesos biológicos que se llevan a cabo durante la liberación de OGs debido a la invasión de las células vegetales por los microorganismos patógenos conllevan a respuestas de defensa tales como la inducción de inhibidores de proteasas, de fitoalexinas, de la fenilalanina amonioliasa (PAL), de peroxidasas y de enzimas involucradas en el metabolismo oxidativo. Durante el crecimiento y desarrollo de las

plantas, los OGs inhiben la elongación estimulada por las auxinas y regulan la morfogénesis de la planta induciendo la floración, inhibiendo el enraizamiento, produciendo síntesis de etileno y también intervienen en la expansión celular y en la citocinesis (Bellincampi et al., 2000; Mathieu 1996).

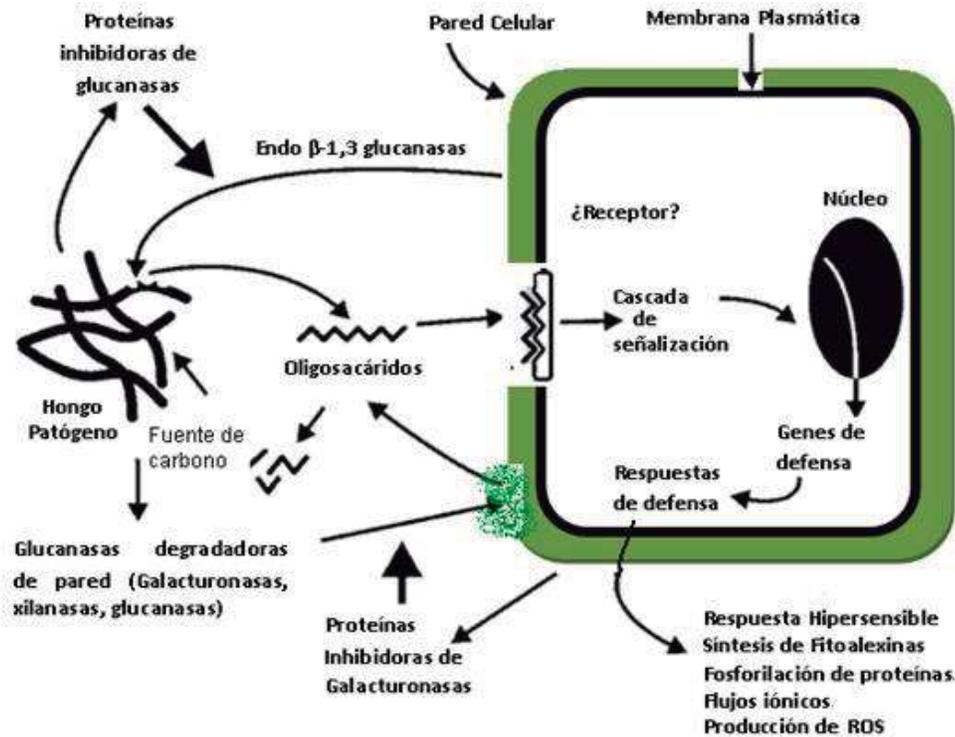


Figura 3. Degradación de la pared celular por las enzimas liberadas. Las glucanasas secretadas por el hongo patógeno actúan sobre la pared celular de la planta liberando pequeños fragmentos de oligosacáridos a partir de los polisacáridos pécticos, (incluyendo los oligogalacturónidos). Los OGs, son reconocidos por receptores extracelulares que desencadena una cascada de transducción de señales, activando genes relacionados a defensa (Modificado de Gomathi y Gnanamanickam, 2004).

1.3.1 Antecedentes de la acción biológica de los oligogalacturónidos (OGs)

Las respuestas observadas por efecto de los OGs dependen de las especies vegetales, tipo de bioensayo y estructura química de los OGs analizados (Côté et al., 1998). En la primera repuesta después de agregar los OGs está claramente implicada la defensa de la planta disparando la producción de ROS que incluyen al H₂O₂ y O₂⁻ (Low y Merida, 1996). Esta explosión oxidativa fue observada minutos después de agregar OGs a los cultivos de células de tabaco y tomate en suspensión (Binet et al., 1998; Rout-Mayer et al., 1997; Stennis et al., 1998).

La despolimerización parcial del HG genera OGs que estimulan reacciones de protección a la planta y también regulan el crecimiento y desarrollo de la misma (Hématy et al., 2009; Silipo et al., 2010). Se ha reportado que los OGs están involucrados en la síntesis del jasmonato durante la activación de los mecanismos de protección de las plantas contra patógenos (Norman et al., 1999) y promueven la acumulación de fitoalexinas en soya, frijol, chícharo y perejil (Davis et al., 1986; Davis y Hahlbrock, 1987; Tepper y Anderson, 1990; Walker-Simmons et al., 1984). Otros de los efectos biológicos producidos por los OGs son la acidificación y movilización de calcio al citosol, la activación de la expresión génica incluyendo a la PAL en zanahoria (Messiaen y Van Cutsem, 1994). Asimismo, los oligómeros pécticos incrementan la producción de etileno en discos de pericarpio de calabacín, tomate y pera (Baladrán-Quintana et al., 2002; Campbell y Labavitch, 1991). Algunos ejemplos de la actividad biológica de los oligogalacturónidos se muestran en la Tabla 1.

Ha sido ampliamente reportado que los OGs activan los dos principales sistemas de defensa de las plantas; el dependiente de ácido salicílico y del ácido jasmónico (Klarzinski et al., 2000). El rango en el tamaño de los oligogalacturónidos biológicamente activos fluctúa entre 9-15 residuos de ácido galacturónico (Cabrera et al., 2008). Sin embargo, se ha reportado que algunos di y trigalacturónidos también estimulan la producción de inhibidores de proteasas en tomate (Moloshok et al., 1992) lo que sugiere que en diferentes tejidos el grado de polimerización (GP) requerido para que presenten actividad biológica es variable. Además, los OGs de cadena corta aumentan la producción de etileno y la expresión de la enzima ácido carboxílico-1-aminociclopropano oxidasa (ACO) en plantas de tomate, donde los pentasacáridos son los más activos (Simpson et al., 1998).

Tabla 1. Actividad biológica de los α -1,4-oligogalacturónidos en plantas (Enriquez-Guevara et al., 2010).

Actividad	GP	Organismo	Referencia
Respuesta de defensa			
Síntesis de fitoalexinas	8-13	Soya	Davis et al., 1986
	3-12	Soya	Komae et al., 1990
	≥ 3	Perejil	Davis y Hahlbrock, 1987
	9-15	Frijol	Dixon 1986; Tepper y Anderson, 1990
	7-14	<i>A. thaliana</i>	Hernández-Mata et al., 2010
Aumento en la actividad de PAL	>9	Zanahoria	Messiaen et al., 1993
	9-15	Frijol	Dixon 1986; Tepper y Anderson, 1990
Sobrerregulación de <i>CHS</i>	9-15	Frijol	Tepper y Anderson, 1990
Aumento en la actividad de β -1,3-glucanasa	≥ 3	Perejil	Davis y Hahlbrock., 1987
Síntesis de lignina	8-11	Pepino	Robertsen 1986
	9-15	Frijol	Tepper y Anderson, 1990
Síntesis de inhibidores de proteasas	2-3	Tomate	Moloshok et al., 1992
Desarrollo y Crecimiento			
Incremento de etileno	15-19	Tomate	Brecht y Huber, 1988
	15-19	Pera	Campbell y Labavitch, 1991
Incremento del crecimiento del tallo	>8	Chicharo	Branca et al., 1988
Formación de flores	10-14	Tabaco	Eberhard et al., 1989; Marfà et al., 1991

GP= Grado de Polimerización; PAL= Fenilalanina amonio-liasa; *CHS*= Chalcona sintasa

Cano et al., (1994) mostraron por medio de cromatografía en Biogel P-6 y P-4, que un OG vegetal de 1968 Da (GP=10) y un oligoglucano de 1476 Da de origen fúngico presentaron efectos aditivos sobre la acumulación de la faseolina de *Phaseolus vulgaris*. El efecto de los OGs relacionados con el desarrollo parece tener una actividad antagónica con las auxinas pero aun no está claro si la capacidad de los OGs para antagonizar con las auxinas se relaciona con su propiedad para inducir respuestas de defensa (Bellincampi et al., 1993; Bellincampi et al., 1996; Mauro et al., 2002). Simpson et al., (1998) mostraron que los OGs con un grado de polimerización de 4-6 residuos activaron la expresión del ácido aminociclopropano-1-carboxil oxidasa (ACO) y por tanto la producción de etileno. Hernández-Mata et al., (2010) reportaron que 10 ng/ml de OGs obtenido de la pared celular de frijol, estimuló la producción de flavonoides los cuales a su vez inhibieron el transporte de auxinas afectando con ello el crecimiento radicular y disparando la síntesis de camalexina como respuesta de defensa en *Arabidopsis thaliana*. Recientemente Savatin et al., (2011) mostraron que en *Arabidopsis* los OGs antagonizan la respuesta a las auxinas independientemente de la estabilización de los represores Aux/IAA.

1.4 Cascada de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) en plantas.

La señalización para la división celular y las repuestas a estrés en plantas se encuentra mediada por la vía MAPK. Además se ha sugerido que las repuestas a las auxinas, al ácido abscísico y posiblemente al etileno y a las citocininas también utilizan dicha cascada (Mishra et al., 2006). Gran parte del estrés de origen biótico (patógenos y elicitores derivados de patógenos) y abiótico (salinidad, bajas temperaturas, drogas y oxidación) puede inducir en las plantas repuestas de defensa a través de la cascada MAPKs (Mishra et al., 2006). La secuenciación completa del genoma de *Arabidopsis thaliana* reveló que existen 60 genes que codifican para las MAPKKK, 10 para las MAPKKs y 20 para las MAPK (Fig. 4) (Katrine et al., 2009). La activación de la cascada MAPK en respuesta a estímulos y estrés ocurre en minutos, como ha sido reportado para las cinasas MAPK3, MAPK4 y MAPK6 de *Arabidopsis* (Asai et al., 2002; Ichimura et al., 2002). Son escasos los receptores que han sido documentados para la activación de las MAPK, entre los cuales se encuentra el receptor tipo cinasa sensible a flagelina 2 (FLS2) activado por un péptido conservado de flagelina bacteriana (flg22), el del EFR que reconoce al factor de elongación bacteriana EF-Tu, y el CERK1 que responde a la quitina (compuesto derivado de la pared celular de hongos) (Katrine et al., 2009).

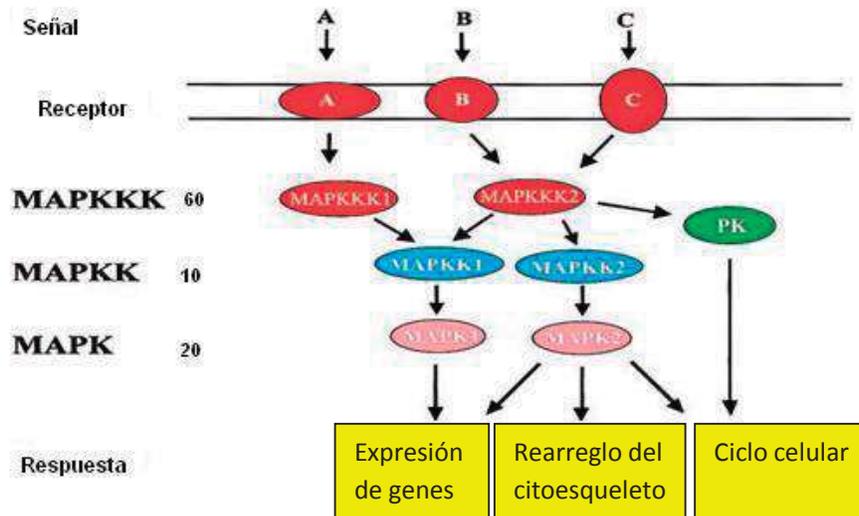


Figura 4. Función básica de la ruta de señalización de las MAPK. En plantas los receptores censan estímulos extracelulares específicos (A, B y C) los cuales activan a las MAPKKKs. La activación de MAPKKKs resulta en la fosforilación de MAPKKs. Estas últimas, activan a su vez a las MAPKs cuyos sustratos incluyen a factores de transcripción, proteínas del citoesqueleto, u otras cinasas o fosfatasas que están directamente relacionadas con las repuestas del ciclo celular. Las flechas indican la activación de los blancos (Miles et al., 2005).

Se ha propuesto que la cinasa MAPK4 funciona en una cascada que incluye a las MAPKKs (MKK1y MKK2) y a la triple cinasa MEKK1 (Ichimura et al, 1998). También se ha reportado que el estrés abiótico y los elicitores bacterianos como la flagelina activan a la MAPK4 (Teige et al., 2004; Suarez-Rodríguez et al., 2007). Los reportes anteriores contrastan con otros que señalan que la MAPK4 funciona como un regulador negativo en la resistencia sistémica adquirida y positivo para el gen de defensa en plantas (PDF1.2) a través de las proteínas EDS1 y PAD4 (PHYTOALEXIN DEFICIENT 4), componentes esenciales de la respuesta de defensa mediada por ácido salicílico (Brodersen et al., 2006; Petersen et al., 2000). La pérdida de función en la mutante *mpk4* mostró elevados niveles de ácido salicílico (SA), acumulación de transcritos relacionado a patogénesis e incremento en la resistencia hacia patógenos biotróficos y mayor susceptibilidad hacia los patógenos necrotróficos (Brodersen et al., 2006; Petersen et al., 2000).

1.4.1 Funciones de las cinasas MAPK3 y MAPK6 en plantas

Las cinasas MAPK3 y MAPK6 de *Arabidopsis* y sus ortólogos en otras especies vegetales han sido de las más estudiadas y se han relacionado con la respuesta de diferentes estímulos (Katrine et al., 2009). La cascada MAPK juega un papel importante en la regulación del desarrollo, crecimiento y respuestas a estímulos ambientales. Por ejemplo, bacterias y hongos encienden la cascada MAPK a través de las proteínas MKK4/MKK5 que activan a las dos cinasas río abajo MAPK3 y MAPK6 confiriéndole a la planta una resistencia contra bacterias y hongos (Asai et al., 2002; Ren et al., 2008). Lu et al., (2002) propusieron que la proteína cinasa MAPK3 regula el crecimiento post-germinativo inducido por el ácido absísico (ABA). Takahashi et al., (2007) identificaron que la cascada que comprende a las cinasas MKK3/MPK6 es activada por el ácido jasmónico (JA) en *Arabidopsis* y regula negativamente la expresión del ATMYC2/JASMONATO INSENSIBLE 1 (JIN1) (Fig.5). Otros estudios han revelado que algunos eventos de fosforilación de proteínas están relacionados con el movimiento y desarrollo de estomas (Hashimoto et al., 2006; Wang et al., 2007). Los estomas se encuentran en la epidermis de la hoja y proporcionan la principal vía para el intercambio gaseoso como la absorción de CO₂ atmosférico y la liberación de O₂ a su entorno, dichas estructuras están formadas por dos células guarda alrededor de un poro abierto (a baja concentración de CO₂) o cerrado en respuesta a niveles elevados de CO₂. Las

mutantes de *Arabidopsis ht1* con alta homología para las MAPKKK están alteradas en su capacidad para controlar el movimiento de los estomas en respuesta a CO₂ (Hashimoto et al., 2006). Además, la pérdida de función de *MKK4/MKK5* o *MAPK3/MAPK6* ocasionó un desarrollo anormal en la agrupación de estomas (Wang et al., 2007). Xu et al., (2008) y Yoo et al., (2008) mostraron *in vitro* e *in vivo* que la cinasa MAPKK9 participa en una cascada que se activa por estrés salino, involucrando así a las proteínas cinasas MAPK3 y MAPK6, lo que resulta en la transcripción de múltiples genes comprendidos en la biosíntesis de etileno y camalexina.

Recientemente Wang et al., (2010) reportaron que el peróxido de hidrógeno enciende a la cascada MAPK que comprende a las cinasas MKK4/5, las cuales activaron a la cinasa MAPK6, incrementando con ello la biosíntesis de óxido nítrico y esto último ocasionó una alteración en el desarrollo de las raíces laterales de *A. thaliana* al activar la isoforma NIA2 de la nitrato reductasa.

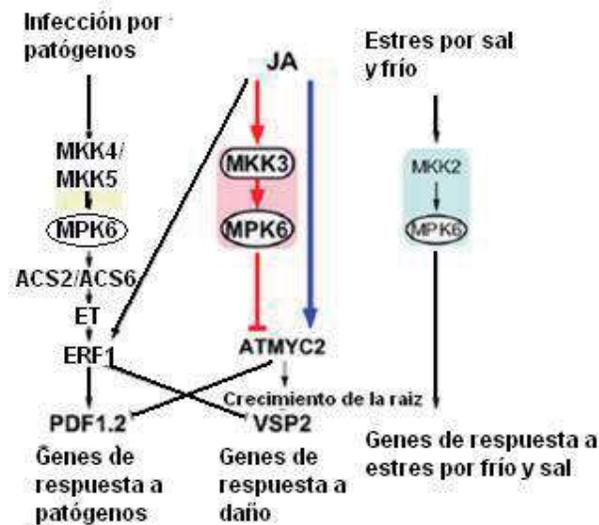


Figura 5. Funciones de la cascada de señalización MAPK6. Al menos tres vías, MKK4/MKK5-MPK6, MKK3-MPK6 y MKK2-MPK6 son activadas en *Arabidopsis*. Cada una de las cascadas antes mencionadas juega un papel específico en respuesta a diferentes estímulos y transducen la señal para adaptarse a cambios ambientales por el cruce de señales entre ellas. La vía MKK4/MKK5-MPK6 regula los genes de respuesta a patógenos activando la biosíntesis de etileno, la ruta MKK3-MPK6 interviene en la señalización por JA y la cascada MKK2-MPK6 regula los genes de respuesta a estreses por sal y frío. La vía activada por JA afecta la expresión de genes dependientes de JA y la sensibilidad del crecimiento de la raíz a través del factor de transcripción ATMYC2 (Takahashi et al., 2007).

1.5 Fitoalexinas

Una gran cantidad de cambios bioquímicos ocurren en las plantas después de una infección y algunos de ellos se han asociado con el mecanismo de defensa que produce sustancias llamadas fitoalexinas (García-Mateos y Pérez-Leal, 2003). Los primeros reportes sobre la presencia de estos metabolitos fueron descritos por Müller y Börger, (1940) donde observaron la resistencia de la papa al hongo *Phytophthora infestans* mediante la producción de compuestos fungitóxicos por la planta hospedera. Los inductores de la síntesis y acumulación de fitoalexinas no sólo provienen de la planta hospedera, sino también del huésped. Una gran cantidad de inductores de la síntesis de fitoalexinas se han identificado en hongos, bacterias, virus y otros patógenos que permiten la liberación o producción de metabolitos de diversa naturaleza química; sales inorgánicas, carbohidratos complejos, oligoglucanos, lípidos, ácidos grasos, oligómeros de tipo quitosanos, polipéptidos y etileno (García-Mateos y Pérez-Leal, 2003). Las fitoalexinas son metabolitos antimicrobianos de bajo peso molecular producidos por la planta durante el ataque del patógeno cuya estructura química varía entre las diferentes familias de plantas e incluye a los flavonoides y terpenoides. Las propiedades antimicrobianas de las fitoalexinas intervienen en el mecanismo de defensa del huésped. La camalexina (3-tiazol-2-il-indol) es la principal fitoalexina de *Arabidopsis thaliana* inducida por una larga variedad de microorganismos, incluyendo bacterias, hongos y oomicetos (Glawischnig 2007). También los PAMPs y toxinas pueden disparar la acumulación de la camalexina (Gust et al., 2007; Qutob 2006; Rauhut et al., 2009; Stone et al., 2000). La vía biosintética de la camalexina (Fig. 6) se deriva del triptófano, el cual es convertido a indol-3-acetaldoxima (IAOx); la reacción es catalizada por dos enzimas homólogas del citocromo P450 CYP79B2 y CYP79B3 (Böttcher et al., 2009; Schuhegger et al., 2006). El indol-3-acetonitrilo (IAN) se forma a partir del IAOx por la enzima CYP71A13 y en algunos casos puede actuar como precursor de auxina (Schuhegger et al., 2006). IAN es un intermediario en la vía biosintética de camalexina que sirve como sustrato para la enzima CPY71B15 (PAD3) en la formación de camalexina a través de dos pasos: en el primero IAN es transformado a ácido dihidroxicamalexina (DHCA) y en el segundo DHCA es convertido a camalexina (Böttcher et al., 2009).

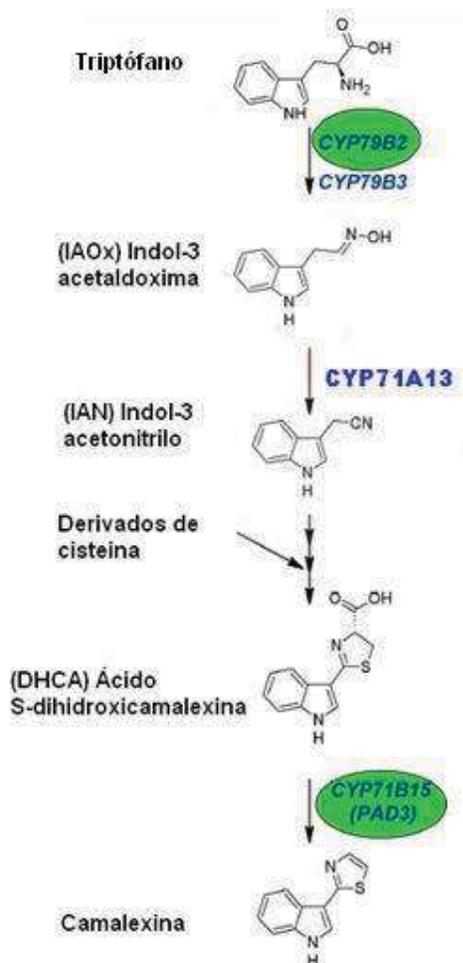


Figura 6. Biosíntesis de la camalexina. La vía involucra dos pasos catalizados por enzimas del citocromo P450 CYP79B2/CYP79B3 que transforma al triptófano a IAOx, mientras que la enzima CYP71B15 (PAD3) convierte DHCA a camalexina (modificada de Böttcher et al., 2009).

Diversos agentes patógenos inducen la acumulación de camalexina en *Arabidopsis thaliana* incluyendo *Pseudomonas syringae*, *Alternaria brassicicola*, *Cochliobolus carbonum* y *Botrytis cinerea* (Glazebrook et al., 1997; Ren et al., 2008; Thomma et al., 1999; Tsuji et al., 1992). Estudios realizados en varios laboratorios demostraron que en tabaco las cinasas MAPK (SIPK y WIPK) y sus ortólogos en otras especies, incluyendo MAPK6 y MAPK3 de *Arabidopsis* se activan después de un tratamiento con los PAMP o infección de patógenos (Zhang y Liu, 2001). La formación de camalexina requiere la activación transcripcional de genes que codifican las enzimas para su biosíntesis tales como las subunidades α y β de la antralinato sintetasa (ASA y ASB), la fosforibosilantranilato transferasa (PAT), la indol-3-glicerolfosfato sintasa (IGPS), las subunidades α y β de la triptófano sintetasa (TSA y TSB), los citocromos P450 CYP79B2, CYP79A13 y PAD3 a través de las cinasas MAPK3/MAPK6 y MAPK4

(Qiu 2008; Ren et al., 2008). Ren et al., (2008) reportaron que las cinasas MAPK3/MAPK6 son activadas mediante la cascada MAPKKK/MEKK1-MKK4/MKK5 encendida por *Botrytis cinerea* y sugiere que la MAPK4 es activada por otros patógenos regulando los mismos genes que las cinasas MAPK3/MAPK6 a través de una vía diferente a las MAP cinasas. En *Arabidopsis* el tratamiento con PAMPs activa a la cinasa MAPK4 la cual fosforila a la proteína MKS1 liberándola del complejo MKS1/WRKY33, esto permite que el factor de transcripción WRKY33 estimule la producción del transcrito de PAD3, enzima necesaria para la biosíntesis de camalexina (Qiu 2008). En un reporte reciente, Mao et al., (2011) mostraron que la inducción de camalexina por el ataque de patógenos en *Arabidopsis* fue precedida por la activación de la cascada MAPKKK/MEKK1-MKK4/MKK5-MPK3/MPK6. La activación de las cinasas MPK3/MPK6 condujo a la fosforilación del factor de transcripción WRKY33 el cual coordina la regulación de múltiples genes que codifican para las enzimas de la biosíntesis de camalexina (Fig. 7).

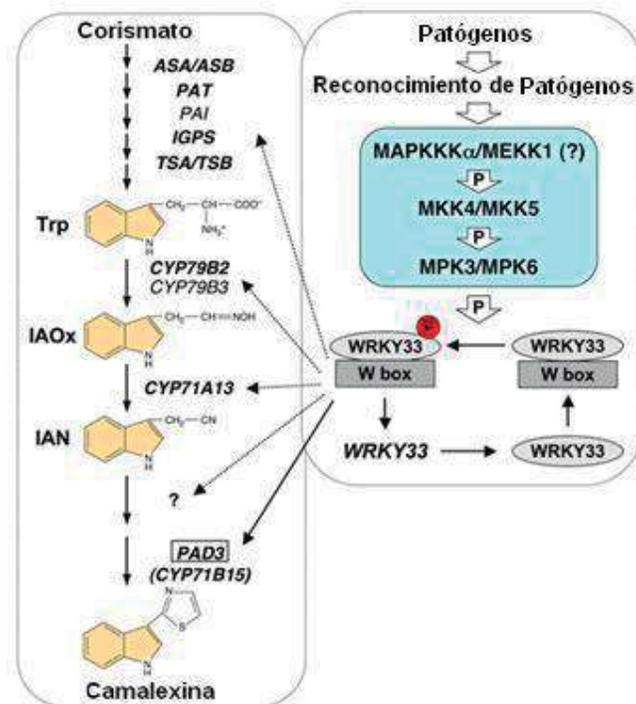


Figura 7. Modelo de la participación del factor de transcripción WRKY33 activado por las cinasas MPK3/MPK6, en la regulación de la biosíntesis de camalexina. La vía biosintética de la camalexina y su regulación se muestra por separado en cajas rectangulares. Después de la fosforilación de WRKY33 por las cinasas MAPK3/MAPK6, dicho factor se une constitutivamente a los elementos *cis* de la caja W de los genes blanco que incluyen al factor de transcripción WRKY33, activando su expresión. Este último promueve una retroalimentación potencial de regulación positiva, río abajo de la cascada MAPK (modificada de Mao et al., 2011).

1.6 *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio.

La elección de sistemas modelos para el estudio del desarrollo se ha guiado por criterios como tamaño pequeño, ciclo de vida corto y mantenimiento simple. Como *Arabidopsis thaliana* reúne los parámetros antes mencionados se ha convertido en el objeto de estudio por excelencia en la mayoría de los laboratorios dedicados a la biología experimental de las plantas. *Arabidopsis* es una planta de la familia Brassicaceae, varias especies comprenden al género de *Arabidopsis*, siendo la más conocida y extensamente usada en investigación la *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*). Esta planta se localiza en todas las regiones de Europa, Asia y en el Norte de África y ha sido introducida a otras áreas incluyendo Norteamérica y Australia. La ventaja de usar *Arabidopsis* en investigación es que su genoma constituido de 125 millones de bases es más pequeño que el de otras plantas, está totalmente secuenciado y contienen aproximadamente 25 000 genes, comprendidos en 5 cromosomas. Esta planta es fácil de cultivar y de rápido crecimiento debido a que el ciclo de vida incluida la germinación de semillas, la formación de la roseta, el tallo principal, floración y la maduración de las primeras semillas abarca un periodo de 6 a 8 semanas, produciendo miles de semillas (Wilson 2000). Las plantas se desarrollan en una roseta de aproximadamente de 2-4 centímetros de diámetro de la cual se desprende un tallo floral que puede alcanzar una altura de 20 a 70 cm. El crecimiento no depende de ninguna época del año y por lo tanto varias generaciones pueden ser producidas en un año, lo que permite el análisis genético rápido. Además se conocen más de 50, 000 mutantes que facilitan las investigaciones destinadas a individualizar los genes y conocer su función (Wilson 2000). A pesar de las pequeñas dimensiones de su genoma haploide, *A. thaliana* presenta las características típicas de otras angiospermas, en lo referente a la morfología, anatomía, crecimiento, desarrollo y respuestas al ambiente. Por lo tanto, los resultados de las investigaciones con esta planta se consideran potencialmente aplicables a cualquier otra planta superior (Bent 2000; Meyerowitz 1994).

1.6.1 Arquitectura de la raíz

La raíz es un órgano de la planta generalmente subterráneo relativamente sencillo que consiste de una raíz primaria, pelos radiculares y raíces laterales. Las raíces presentan una gran variedad de funciones biológicas como la absorción de nutrientes y

en ciertas especies constituye un órgano importante de almacenamiento de nutrientes (Montiel et al., 2004). La raíz posee varias características que hacen de ella un sistema adecuado para el estudio experimental de la organogénesis. El crecimiento continuo de la raíz se da a través de la actividad proliferativa del meristemo apical radicular, en tanto que por procesos de diferenciación se producen los diferentes tipos de tejidos y células presente en la raíz madura (López-Bucio et al., 2005). La morfología de la raíz permite dividirla en diferentes zonas: división, elongación, diferenciación y maduración celular (Fig. 8A) (Montiel et al., 2004). El meristemo de la raíz provee de nuevas células, las cuales se añaden a las filas preexistentes extendiéndose hacia la raíz madura. Arriba del meristemo radicular se localiza la zona de elongación en la cual se añaden nuevas células que después se expanden totalmente y se diferencian en la zona de maduración (Casson y Lindsey, 2003). Bajo condiciones ambientales favorables, la formación de pelos radiculares ocurre en la zona de diferenciación a partir de las células de la epidermis de la raíz primaria (López-Bucio et al., 2005). La raíz de *A. thaliana* presenta una simple anatomía compuesta del exterior al interior por varias capas celulares: epidermis, cortex, endodermis y periciclo, esta última envuelve el tejido vascular (Fig. 8 B) (Péret et al., 2009). La formación de raíces laterales es un proceso organogenético de gran importancia que contribuye al establecimiento de la arquitectura de la raíz en plantas superiores (Fukaki et al., 2009). Las raíces laterales se forman a partir de células del periciclo adyacentes al protoxilema denominadas células fundadoras (Beekman et al., 2001; Casimiro et al., 2001; Casimiro et al., 2003; Himanen et al., 2002). En regiones distales del meristemo la mayor parte de las células del periciclo se arrestan en la fase G1 del ciclo celular, mientras que las adyacentes al protoxilema avanzan hacia la fase G2, arrestándose en esta fase como células competentes para formar primordios laterales. Estos últimos en respuesta a un incremento en las auxinas son capaces de comenzar a dividirse de nuevo para formar un primordio de raíz lateral. En *Arabidopsis* la mayoría de los primordios de raíces laterales (PRL) derivan de dos células del periciclo próximas al xilema (Kurup et al., 2005). El desarrollo de los primordios se ha dividido en ocho estadios, en los que tras sucesivos procesos de división anticlinal (perpendicular al eje de la raíz), periclinal (paralela a la dirección de la raíz) y expansión celular se genera un primordio con organización similar al meristemo de la raíz primaria (Malamy y Benfey, 1997).

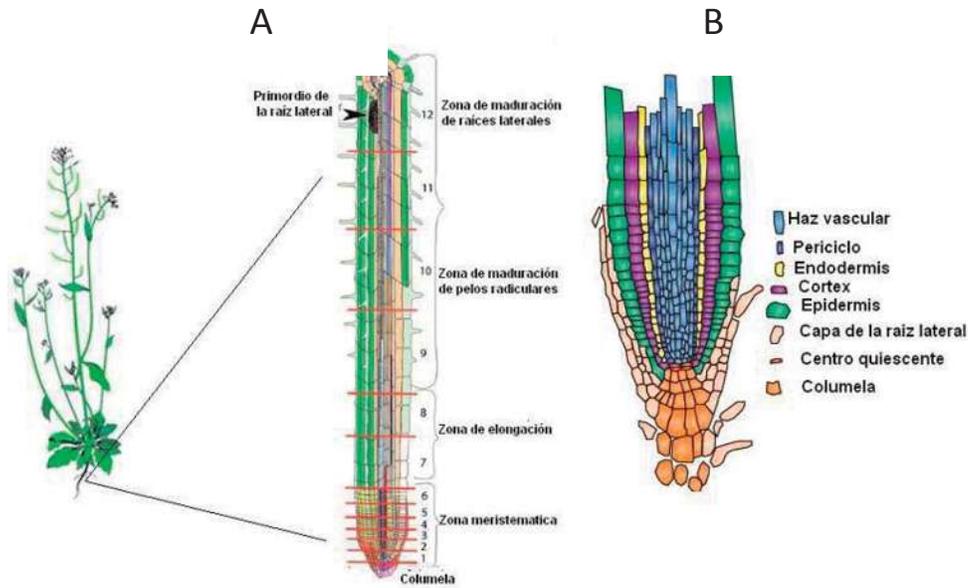


Figura 8. Arquitectura de la raíz principal. A) La raíz se compone de tres zonas específicas; diferenciación, elongación y división. En las células de la zona de elongación la división se detiene y las células se expanden rápidamente en sentido longitudinal. Finalmente en la zona de maduración las células se diferencian y adquieren sus funciones especializadas como la aparición de los pelos radiculares y las raíces laterales. B) Representación esquemática de la zona meristemática o de división de la raíz donde se puede apreciar los distintos tipos celulares que la forman (Modificado Jaillais y Chory 2010; Van-Norman and Benfey 2009).

1.7 Análisis de la expresión génica

La expresión de un gen comienza con la transcripción, proceso que consiste en la síntesis de una molécula de RNA mediante la copia de una porción de una de las hebras del DNA (Hernández et al., 1994). En dicha expresión, el mRNA se analiza por varias técnicas, siendo las más usadas el Northern blot y la amplificación del transcrito por una reacción de transcripción reversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). La técnica de RT-PCR es una adaptación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que permite detectar y medir la acumulación de mRNAs en órganos, tejidos o células. Para que el transcrito sea amplificado por PCR, el RNA debe primero ser convertido a una copia de DNA (cDNA), utilizando la enzima DNA polimerasa dependiente de RNA (transcriptasa reversa RT) y posteriormente se amplifica la copia por PCR (Van Pelt-Verkuil et al., 2008). La PCR es una técnica que permite amplificar secuencias de DNA *in vitro* con una DNA polimerasa por la repetición de la reacción de elongación a partir de oligonucleótidos o cebadores específicos. Esta técnica, pudo

desarrollarse gracias al descubrimiento de la eubacteria termófila *Thermus aquaticus* que vive a temperaturas de 70 a 75 °C y cuya DNA polimerasa es estable hasta 100 °C. La técnica de amplificación *in vitro* se basa en la repetición de los siguientes procesos:

- La desnaturalización de las dos cadenas de DNA a una temperatura elevada (cerca de 95 °C) para producir moléculas de DNA monocatenarias.
- La hibridación (*annealing*) de los oligonucleótidos o cebadores complementarios a las secuencias de los extremos del DNA a amplificar, para ello se baja la temperatura a valores normalmente comprendidos entre 40 y 65 °C.
- La reacción de elongación se lleva a cabo a partir de los oligonucleótidos, usando una DNA polimerasa termoestable (para la *Taq* polimerasa la temperatura óptima es de 72 °C).

Los productos de elongación se desnaturalizan de nuevo por calor y se repite el proceso, de manera que en cada ciclo el número de copias de DNA se duplica, obteniéndose 2ⁿ moléculas después de n ciclos (Tagu y Moussard, 2003).

1.8 Transformación de plantas por *Agrobacterium tumefaciens*

Chilton (1977) mostró la presencia de un pequeño fragmento de DNA de la bacteria de *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) en aislados de tumores axénicos de la agalla de corona en tabaco. Con estos experimentos se demostró la capacidad de esta bacteria para transferir DNA entre reinos diferentes. *A. tumefaciens* y sus especies son patógenos reconocidos por la planta que tienen la capacidad de integrar su material genético dentro del genoma de su hospedero (Valderrama et al., 2005). Los genes del DNA-T (en inglés T-DNA) son expresados en su hospedero e inducen la formación de tumores y la síntesis de algunos derivados de aminoácidos llamados opinas. Este proceso se lleva a cabo mediante el plásmido Ti (tumor-inducing) de *A. tumefaciens* que contiene la mayor parte de la información genética para permitir la transferencia de parte de su secuencia al genoma de la célula huésped. La fracción del plásmido Ti transferido a la célula vegetal se designa como T-DNA. Esta región está delimitada por dos repeticiones directas de 25 pares de bases, los extremos izquierdo y derecho. Entre estos extremos se encuentran; (I) los oncogenes cuya expresión induce una desregulación del balance hormonal de las células transformadas induciendo el crecimiento del tumor; (II) genes que controlan la síntesis de opinas, aminoácidos conjugados a un azúcar que pueden ser utilizados únicamente por la bacteria y no por la

célula vegetal. Las proteínas encargadas de transferir a la célula vegetal el DNA que se encuentra entre los extremos están codificadas por los genes de virulencia agrupados en la región *vir* del plásmido Ti. La transformación se efectúa cuando los tejidos provenientes de flores, tallo o discos foliares se ponen en contacto con un cultivo de *A. tumefaciens* en condiciones controladas. Durante esta etapa de co-cultivo el T-DNA modificado se transfiere a la célula vegetal y se integra en su genoma. Posteriormente una serie de lavados sucesivos permite eliminar las bacterias y el tejido vegetal se cultiva en presencia de un antibiótico que permita la selección de las células transformadas genéticamente. Estas células pueden ser multiplicadas y cultivadas en un medio adecuado para la regeneración de plantas completas, a partir de brotes adventicios o embriones somáticos. Las plantas transgénicas entonces se caracterizan molecularmente; primero se comprueba la integración del T-DNA en el genoma y se estima el número de copias integradas; se corrobora también el nivel de expresión de los genes introducidos y la acumulación de sus correspondientes proteínas. El fenotipo de las plántulas transgénicas se analiza por comparación con el de las plantas no transformadas. En el caso de *A. thaliana* se ha desarrollado un método de transformación que permite su utilización a gran escala y consiste en sumergir las flores inmaduras de la planta en un cultivo de *A. tumefaciens*, seleccionándose las plantas transgénicas a partir de las semillas producidas por estas flores (Bent 2000; Tagu y Moussard, 2003).

1.8.1 Sobreexpresión de genes

La sobreexpresión de un gen es una herramienta útil dentro de la biotecnología. Un prerrequisito para llevar a cabo la sobreexpresión es el de conocer la secuencia o haber clonado la secuencia del gen de interés. (Tagu y Moussard, 2003). El objetivo de la sobreexpresión de un gen es observar cualquier cambio fenotípico y bioquímico asociado con la alteración de la expresión de un gen de interés (Lloyd 2003). La obtención de plantas de sobreexpresión de las cinasas AtMAPK3 y AtMAPK6 (usada en este estudio) se realizó amplificando el cDNA del gen por RT-PCR; posteriormente el fragmento amplificado fue clonado en el vector pT-Adv, secuenciado y posteriormente subclonado en el vector binario pFGC1008 entre el promotor CaMV35s y el terminador ocs 3'. Este vector fue transferido a través de *A. tumefaciens* y esta bacteria fue usada para transformar a la planta de *A. thaliana* y las líneas transformantes fueron verificadas por análisis de PCR (Lu et al., 2002).

1.8.2 Silenciamiento de genes por la técnica de RNA de interferencia (RNAi)

El silenciamiento génico mediado por RNA es un mecanismo regulador de la expresión que suprime a nivel post-transcripcional la expresión de un gen por especificidad de secuencia. Este sistema se ha descrito en diferentes clases de organismos eucariontes, hongos como *N. crassa*, plantas y animales (Elbashir et al., 2001; Napoli et al., 1990; Romano y Macino, 1992). El silenciamiento se lleva a cabo de la siguiente manera: parte del RNA producido por los transgenes o transposones, son reconocidos por la maquinaria de silenciamiento y desencadenan la respuesta a través de una RNA polimerasa dependiente de RNA (enzima que reconoce estos RNAs y los convierte en RNAs bicatenarios). Estos últimos son procesados por una endonucleasa del tipo RNasa II (Dicer) en una reacción dependiente de ATP para generar moléculas bicatenarias cortas de RNA denominadas RNA de interferencia (siRNAs). Los siRNAs que presentan una longitud variable según el organismo, suelen tener entre 21 y 25 nucleótidos que se incorporan en un complejo de RNasa multicomponente denominado *RNA-inducing silencing complex* (RISC) que sirven como moléculas “guía” para la degradación endonucleolítica del RNAm homólogo (Agarwal et al., 2003; Dykxhoorn et al., 2003).

1.8.3 Mutagénesis

En diferentes organismos, las mutantes han sido cruciales para descubrir y estudiar funciones génicas y pueden encontrarse naturalmente o ser generadas en el laboratorio. En *Arabidopsis* se han generado mutantes mediante varias técnicas de mutagénesis: empleando compuestos químicos, radiación o por la inserción aleatoria de fragmentos de DNA como los transposones o T-DNA (DNA “transferido”). El uso de agentes insercionales como T-DNA o transposones permite la identificación del gen mutado de manera relativamente sencilla. La mutagénesis con T-DNA se basa en la inserción de un fragmento de DNA por medio de *A. tumefaciens* que infecta naturalmente a la planta. Generalmente se trata de un fragmento codificado en un plásmido especial que ha sido modificado para fines de ingeniería genética (Gelvin 2003). En el laboratorio se hace uso de este tipo de inserciones o ya sean para la interrupción de genes, para su silenciamiento con vectores o para la adición de nuevos genes a la planta (Marsch-Martínez et al., 2009). La mutante *mapk6* de *A. thaliana* que se utiliza en el presente

trabajo se obtuvo por mutación de inserción de T-DNA que dio lugar a una pérdida completa de función.

II. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la cascada de las MAPK, específicamente las cinasas MAPK3/MAPK6 han sido involucradas tanto en el desarrollo como en la activación por patógenos de genes relacionados a la biosíntesis de camalexina, en el presente estudio determinaremos si una mezcla de oligogalacturónidos (OGs) alteran el desarrollo y la producción de camalexina en *A. thaliana* a través de la vía MAPK.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Los oligogalacturónidos (OGs) alteran la arquitectura radicular de *Arabidopsis thaliana* y promueven la biosíntesis de camalexina activando la cascada MAPK.

Objetivo General:

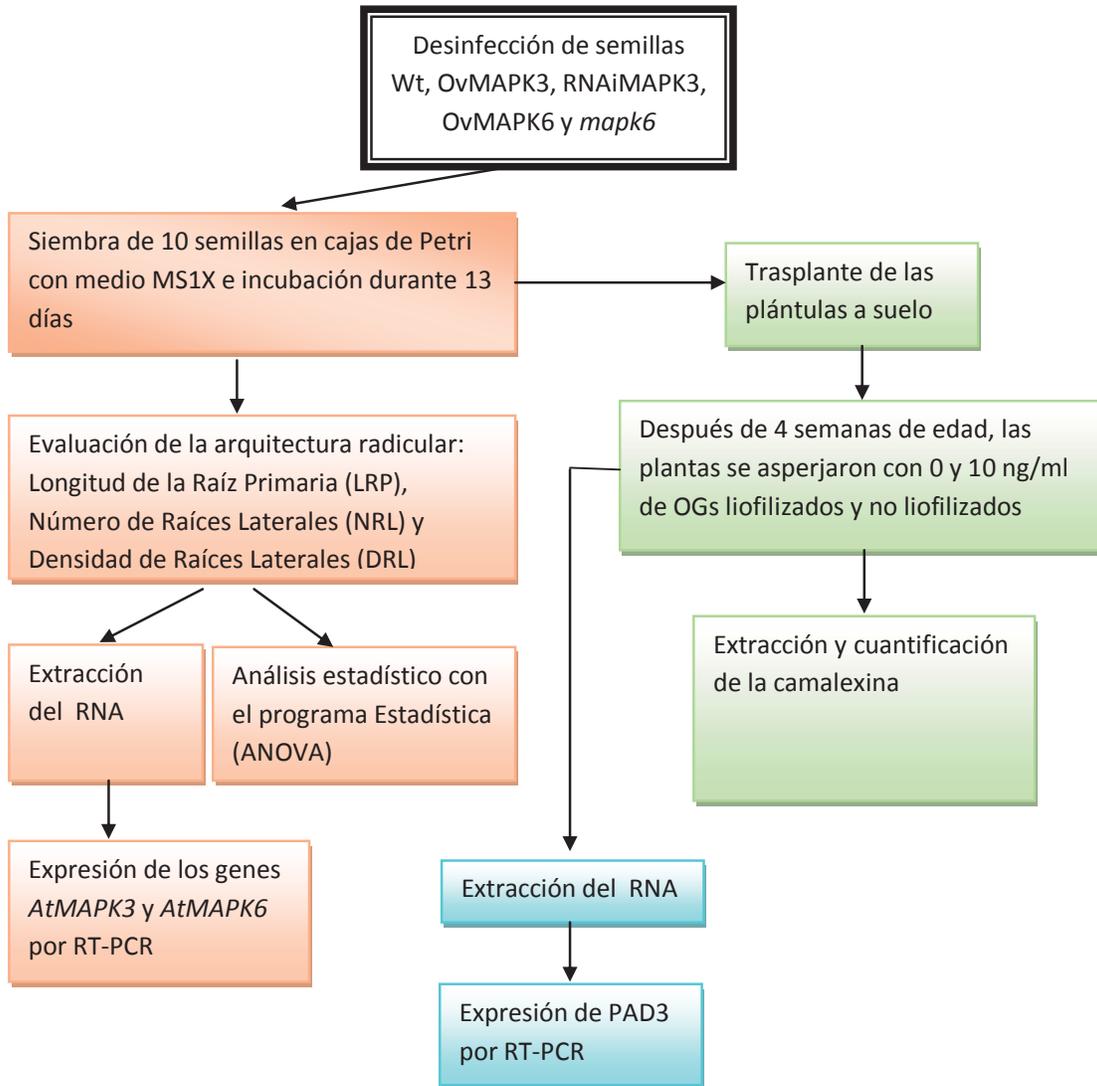
Determinar si el efecto de los OGs sobre el desarrollo radicular y la producción de camalexina en *Arabidopsis* es a través de la activación de la cascada MAPK.

Objetivos Específicos

1. Corroborar la ausencia de función del gen *AtMAPK6* en plántulas de las líneas mutantes *mapk6* mediante RT-PCR.
2. Analizar el efecto de los OGs sobre la arquitectura radicular en plántulas de *A. thaliana* silvestres (Col-0), *mapk6*, OvMAPK6, RNAiMAPK3 y OvMAPK3.
3. Analizar el efecto de los OGs sobre la expresión de los genes *AtMAPK3*, *AtMAPK6* en plántulas silvestres (Wt), *mapk6*, OvMAPK6, RNAiMAPK3 y OvMAPK3.
4. Determinar el efecto de los OGs sobre la síntesis de camalexina en plantas adultas de *A. thaliana* (Col-0), *mapk6*, RNAiMPK3.
5. Determinar el efecto de los OGs sobre la expresión del gen *PAD3* en plantas adultas de *A. thaliana* Wt, *mapk6*, RNAiMAPK3.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Estrategia experimental



4.2 Semillas

Se utilizaron semillas de *A. thaliana* silvestre (Wt) Col-O, de la mutante *mpk6*, de las líneas de sobre OvMAPK6, OvMPK3 y de baja expresión RNAiMPK3 donadas amablemente por el Dr. Ángel A. Guevara García del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

4.3 Reactivos

Los OGs se obtuvieron a partir de la hidrólisis de las paredes celulares de tallos de plantas etioladas de frijol. Dichas paredes se trataron con poligalacturonasa y el hidrolizado se separó mediante cromatografía en columna de Bio-Gel. Los OGs aislados fueron analizados mediante MALDI TOF-TOF donde se encontró que dicho aislado es una mezcla de OGs con grado de polimerización de 6 a 13 monómeros de GalA (Hernández-Mata et al., 2010). Los reactivos que se utilizaron fueron los siguientes; sales del medio Murashige and Skoog (MS) tiamina, piridoxina, ácido nicotínico, sacarosa, gelrite, agarosa, agua grado biología molecular (marca Sigma). El reactivo de Trizol, el inhibidor de RNasa, el Kit SuperScript III One-Sep RT-PCR System With Platinum® Taq DNA polymerase, fueron Invitrogen. El GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain fue de Biotium. El alcohol etílico, isopropanol, cloroformo e hidróxido de potasio (KOH), son reactivos JT Baker; el alcohol metílico (Mallinckrodt), el hexano (Merck), el acetato de etilo (Baxter), el hipoclorito de sodio al 8% de cloro libre (cloralex) y el Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) (Research Organic).

4.4 Equipo

Potenciómetro Daigger, 6173; Balanza Analítica, Sartorius TE612; Balanza Granataria OHAUS GA110; Termociclador Perkin Elmer 2400; Centrifuga refrigerada Hermle-labor technik 2400k; Microcentrifuga, Labnet 16 M; Nanocentrifuga Labnet SN04061572; Vortex-Genie 2 Scientific Industries G-650; Micropipetas RAININ pipet-lite 6070026; Fuente poder BIO-RAD power pac™; Basic sistem Documentador de geles: It 50 módulo integrado de cámara digital de alta resolución 5.0 megapixeles; Cámara de crecimiento con temperatura controlada (22 °C) y fotoperiodo de 16h luz y 8h oscuridad; campana de flujo laminar, Thermoelectron Corporation 1839; estereomicroscopio Iroscope ES-24; Autoclave HA-300MII; Espectrofotómetro Beckman 640; cámaras de cromatografía; Espectrofluorofotómetro Shimadzu, RF

5000U; la centrifuga con vacío Integrated SpeedVac System 155110 y el equipo para electroforesis sumergida Owl separation systems.

4.5 Desinfección de semillas

Las semillas contenidas en un tubo Eppendorf se desinfectaron añadiendo un ml de agua tridestilada estéril e incubándolas por 10 min con agitación ocasional. Después de centrifugar se eliminó el agua y se adicionó un ml de etanol absoluto, se agitó perfectamente por un minuto, se centrifugó y eliminó el etanol. En seguida se agregó un ml de solución desinfectante (cloro 5 %, SDS 1%), agitándose vigorosamente por 5 minutos, se centrifugó y eliminó la solución. Después de 9 lavados con agua tridestilada estéril, las semillas se incubaron en un ml de agua estéril por 48 hrs a 4 °C antes de ser sembradas.

4.6 Preparación de medio de cultivo

Para preparar el medio de cultivo se disolvieron 10 g de sacarosa en un litro de agua tridestilada, posteriormente se agregaron 4.3g de sales MS y se ajustó la solución a pH 5.7. Antes de esterilizar se agregó 8g de gelrite. La esterilización se efectuó a 121 °C por 20 minutos. Finalmente, al medio tibio se le añadió 200 µl/l de una solución stock de vitaminas (tiamina 1 mg/ml, piridoxina 5 mg/ml, ácido nicotínico 5 mg/ml) y los oligogalacturónidos (OGs) fueron adicionados en una concentración de 10 ng/ml a partir de una solución stock de 1567.16 µg/ml.

4.7 Condiciones de crecimiento

Trascurridos los dos días de vernalización, 10 semillas por caja se sembraron en los medios de cultivo. El material se incubó en una cámara con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad a una temperatura de 22° C. Las cajas de Petri se colocaron en forma vertical para que las raíces de la plántula crecieran sobre el medio. Después de 13 días de haber sido sembradas, se analizó la arquitectura radicular mediante los siguientes parámetros: Longitud de la Raíz Primaria (LRP), Número de Raíces Laterales (NRL) y Densidad de Raíces Laterales (DRL). Las observaciones del sistema radicular de las plántulas de *A. thaliana* se hicieron con un estereomicroscopio (Iroscope ES-24). Las raíces laterales que emergieron de la raíz principal se observaron con el objetivo 4X y se obtuvo el número total de raíces en cada una de las plántulas. La longitud de la raíz primaria de cada una de las plántulas se midió con una regla. La densidad de raíces

laterales se obtuvo dividiendo el número de raíces laterales sobre la longitud de la raíz primaria. También se obtuvieron plántulas de 13 días y se transplantaron a suelo para obtener plantas de 4 semanas, el material se incubó en una cámara con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad a una temperatura de 25° C a las cuales se les extrajo camalexina y RNA.

4.8 Extracción y cuantificación del RNA

La extracción del RNA se efectuó en plántulas de *A. thaliana* silvestre Wt, mutantes *mapk6*, de sobre-expresión OvMAPK6, líneas de baja y sobre-expresión para el gen *MAPK3*, (RNAi *MAPK3* y OvMAPK3 respectivamente), mediante el método del Trizol el cual se describe a continuación:

1.- Se molieron de 50-100 mg de tejido congelado con nitrógeno líquido, el polvo se transfirió a un tubo Eppendorf al cual se adicionó un ml de Trizol. Se homogenizó la muestra agitando con la mano.

2.- Las muestras se incubaron por 5 min a temperatura ambiente y posteriormente se adicionó 0.2 ml de cloroformo seguido de una agitación vigorosa por 15 seg e incubó a temperatura ambiente por 2 a 3 min. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm por 15 min. a 4 °C para separar las fases orgánica y acuosa.

3.- La fase acuosa se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo donde se precipita el RNA con 0.5 ml alcohol isopropílico. Se incubó la muestra a temperatura ambiente por 10 min, transcurrido el tiempo se centrifugó a 12000 rpm a 4 °C por 10 min.

4.- Después de remover el sobrenadante, se lavó la pastilla de RNA con 1 ml de etanol al 75 % con agitación en un vórtex, finalmente se centrifugó a 7500 rpm por 5 min a temperatura ambiente.

5.- Al final del proceso se secó la pastilla en campana de flujo laminar y se resuspendió el RNA en agua libre de RNasa, donde se incubó por 10 min a 60 °C. A la solución de RNA se añadió 0.5 µl de inhibidor de RNasa y se almacenó a - 20 °C.

Para analizar la integridad del RNA obtenido, se cargó una alícuota de las muestras (previamente mezclada con buffer de carga) en un gel de agarosa al 1%. Se corrió el gel y al finalizar la corrida observó en un transiluminador con luz UV. Por otra parte, se

cuantificó el RNA midiendo la absorbencia de una alícuota de la solución en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm.

4.9 Extracción de camalexina

1.- 30-40 mg de tejido se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, al cual se adicionó 400µl de metanol puro y se incubó en un baño a 65°C por 20 min.

2.- Se removió el tejido y el extracto metanólico se concentró bajo presión reducida en un SpeedVac hasta reducirlo a un volumen de 75 µl.

3.- Se extrajo la muestra con 75 µl de cloroformo, se removió la fase clorofórmica a tubos limpios y se evaporó a sequedad en un SpeedVac.

4.- Las muestras obtenidas (residuo verde) se resuspendieron en 5 µl de cloroformo y se colocaron sobre una placa de de cromatografía en capa fina (TLC), aproximadamente a 2 cm del fondo de la placa.

5.- La placa se colocó en una cámara de cromatografía (200 ml de acetato de etilo y 30 ml de hexano). El cromatograma se desarrolló hasta que el frente del solvente estuvo a 2 cm del borde de la placa.

6.- Se removió la placa de la cámara y se dejó secar en la campana de extracción por 10 min. Se examinó la placa con luz ultravioleta y se marcó la mancha del control correspondiente a camalexina que fue visible como una mancha azul brillante.

7.- Se raspó la sílica que contiene la camalexina y se extrajo con 1 ml de metanol puro. La sílica se removió por centrifugación obteniendo sólo el sobrenadante. Se midió la fluorescencia en un fluorímetro a 315 nm excitación y 385 nm emisión usando una celda de cuarzo. Los resultados de la fluorescencia se interpolaron en una curva patrón de camalexina pura previamente realizada.

4.10 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen *AtMAPK3*; sentido: **5'-AACTCACGGAGGACAGTTCATAAG-3'** y antisentido: **5'-GCAATTTAGCAA GGTACTGGTGAT-3'** (Juárez-Domínguez et al., 2010). Los oligonucleótidos para la amplificación del gen *AtMAPK6* fueron sentido: MPK6-F2, **5'GCCTCAGATGCCT**

GGGATTGAGAATATTC-3' y antisentido: MPK6-RT-R2, **5'-AGAGTGGCT TACGGTCCATTAACCTCCATG-3'** (Bush y Krizan, 2007). La amplificación del gen *PAD3*, se realizó con los oligos: sentido **5'-CGTCCCCGTGGTTCGCGATC TCTTCG -3'** y antisentido **5'-TGCCAGCGACTCCACCAATCCCTGC-3'** (Hernández-Mata et al., 2010). Como control de expresión se utilizó el gen *Ubiquitina*: sentido **5'GGAAGAAGAAGACTTACACC-3'** y antisentido: **5' AGTCCACACTT ACCACAGTA- 3'** (Ping et al., 2006).

4.11 Amplificación de los transcritos por RT-PCR

Para llevar a cabo la amplificación de transcritos, se utilizó el Kit SuperScript. III One-Step RT-PCR System with Platinum® *Taq* DNA Polymerase de Invitrogen bajo el siguiente protocolo:

- 1.- Se adicionaron a un tubo Eppendorf de 0.2 ml para PCR los siguientes componentes: 12.5 µl de 2X reaction mix, 1 µl (0.64 µg/ µl) de RNA, oligonucleótidos; sentido 1 µl (10 pM), antisentido 1 µl (10 pM), 0.5 µl de SuperScript III RT/Platinum *Taq* Mix y agua grado biología molecular para llevar a un volumen total de 25 µl.
- 2.- Mezclar suavemente para asegurar que todos los componentes están en el fondo del tubo.
- 3.- Colocar la mezcla de la reacción en el termociclador programado con las siguientes condiciones:

Las condiciones que se utilizaron para amplificar el transcrito *AtMAPK3* fueron las siguientes: 30 min a 50 °C; 2 min a 94 °C; 25 ciclos de 30 seg a 94 °C; 1 min a 55 °C y 1 min a 68 °C; posteriormente 5 min a 68 °C. Para *AtMAPK6*, 30 min a 50 °C; 5 min a 94 °C; 25 ciclos de 15 seg a 94 °C; 1 min a 67 °C y 45 seg a 68 °C; posteriormente 10 min a 68 °C. Para *UBIQUITINA* y *PAD3* (At3g26830); 30 min a 50 °C; 5 min a 94 °C; 35 ciclos por 15 seg a 94 °C; 1 min a 67 °C y 45 seg a 68 °C y posteriormente 10 min a 68 °C. El tamaño de los genes amplificados se analizó mediante una electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain cargando 3 µl de la reacción más 2 µl de buffer de carga, así como también un marcador de peso molecular.

4.12 Análisis densitométrico

El análisis densitométrico se realizó mediante el programa “Image J”, donde inicialmente se obtuvieron negativos de la imagen del gel a analizar. Sobre esta última imagen se midió el área de las bandas de las muestras problemas y del control (en este caso ubiquitina). La expresión relativa se determinó dividiendo el valor del área problema entre el área control.

V. RESULTADOS

5.1 Determinación de la expresión del gen *AtMAPK6* por RT-PCR

Primeramente se analizó la expresión del gen *AtMAPK6* para corroborar que efectivamente se contaba con la mutante *mapk6* de *Arabidopsis thaliana*. Para ello, se obtuvo la secuencia del gen *AtMAPK6* (At2g43790) en la base de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Fig. 9A) en la cual se identificó el par de oligonucleótidos sentido y antisentido reportados por Bush y Krysan, (2007). El gen *AtMAPK6*, fue localizado en el segundo cromosoma de *A. thaliana*, comprendido entre las bases 18138307 a 18140988 y cuenta con 6 exones y 5 intrones, su cDNA presenta un tamaño de 1653 pb (Fig. 9B).

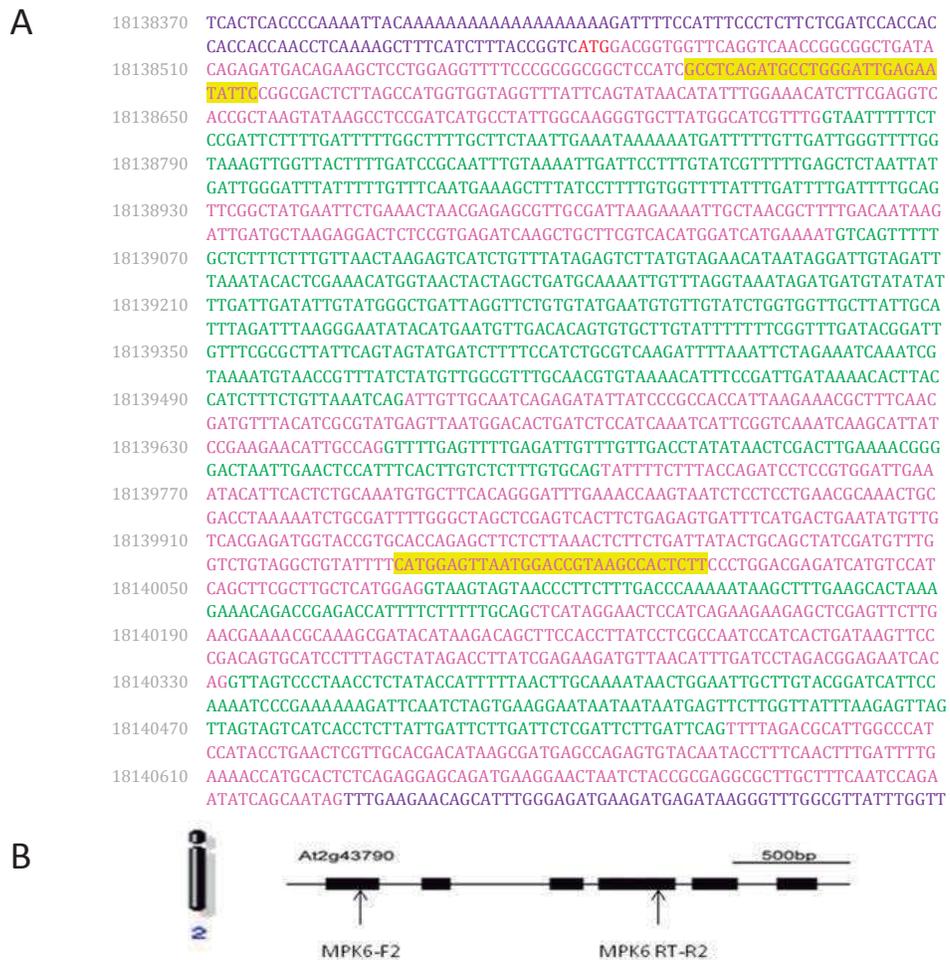


Figura 9. Estructura del gen *AtMAPK6*. A) Secuencia gen *AtMAPK6*. En letras de color rosa se representan los exones y en verde los intrones. Los oligonucleótidos utilizados en el presente estudio están marcados con amarillo. B) Estructura detallada del gen donde los exones se muestran en barras negras y en líneas negras delgadas los intrones (NCBI; At2g43790).

Después de obtener el material vegetativo se procedió a la extracción del RNA de plántulas Wt y *mapk6* (13 días de edad), a partir del cual se efectuó un RT-PCR para determinar la expresión del gen *AtMAPK6*. Como se puede observar en la Fig. 10, el gen se expresó solamente en la muestra de las plántulas Wt (Col-O). El tamaño de amplificación esperado fue de 720 pb, comprendido entre los de oligonucleótidos sentido y anti-sentido MPK6-F2 y MPK6 RT-R2 localizados en el primero y cuarto exón. Cabe mencionar que las otras líneas de sobre y baja expresión (OvMAPK3 y RNAiMAPK3) fueron previamente analizadas y reportadas por Juárez-Domínguez et al., (2010) en donde encontraron que efectivamente en las plántulas OvMAPK3 y RNAiMAPK3 se presentó un incremento y una disminución respectivamente en el nivel de expresión de dicho gen respecto a la línea silvestre (Wt). Por otra parte, Santillán-Mendoza (2011), analizó y reportó que en la línea de sobre-expresión (OvMAPK6) efectivamente incrementó el nivel de dicho transcrito respecto a la Wt.

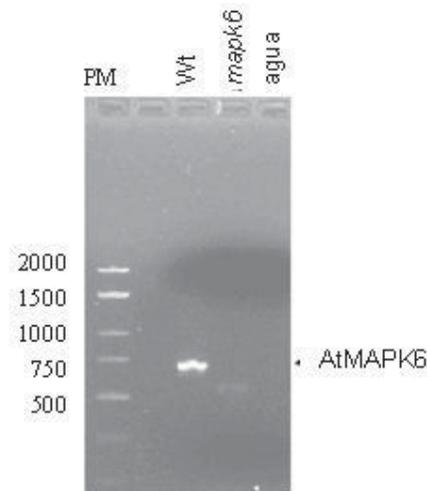


Figura 10. Expresión del gen *AtMAPK6*. El producto del RT-PCR muestra una banda de amplificación de 720 pb solamente en la muestra de las plántulas Wt (Col-0). Se utilizó como control negativo agua donde como se esperaba no se observó ninguna amplificación (n=3).

5.2 Análisis de la arquitectura radicular de las plántulas de sobreexpresión y mutantes de *MAPK6* en *A. thaliana*.

Como se mencionó anteriormente algunos autores han reportado que la cinasa MAPK6 está implicada en el desarrollo y crecimiento de la planta (Hashimoto et al., 2006; Wang et al., 2007), por tal razón se analizó el efecto ocasionado sobre la arquitectura radicular por el cambio genético que se realizó sobre las plántulas de *A. thaliana* al sobre-expresar y mutar el gen *MAPK6*. Las semillas Wt (Col-0), de sobre-

expresión (OvMAPK6) y de la línea mutante *mapk6* fueron sembradas y crecidas en medio MS 1X y 1% de sacarosa durante 13 días. Como se observa en la Fig. 11A, solamente en las plántulas de sobre-expresión OvMAPK6, la LRP fue ligeramente incrementada respecto a las plántulas silvestres Col-0; mientras que en los parámetros NRL y DRL las mutantes *mapk6* mostraron una disminución marcada respecto a Col-0 (Fig. 11 B y C). Los resultados antes mencionados sugieren que la ausencia de función en MAPK6 modifica la arquitectura radicular de *A. thaliana* sugiriendo así una participación de MAPK6 sobre el desarrollo radicular.

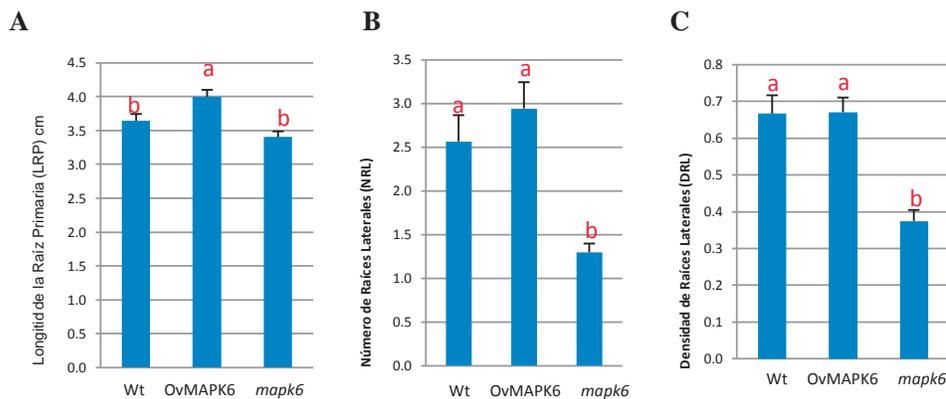


Figura 11. Arquitectura radicular de plántulas de *A. thaliana* Wt, OvMAPK6 y *mapk6*. Las semillas de *A. thaliana* se sembraron en medio MS 1X durante 13 días. **A)** Longitud de la raíz primaria **B)** Número de raíces laterales **C)** Densidad de raíces laterales. Los valores son el promedio de 30 plántulas de dos experimentos independientes (P<0.05). Las letras indican la diferencia estadística obtenida por un análisis de varianza (ANOVA).

5.3 Efecto de los OGs sobre la arquitectura radicular en líneas de sobre expresión y mutante para el gen *AtMAPK6*.

Una vez analizado el desarrollo de la arquitectura radicular de las plántulas de sobre-expresión y la KO para el gen *MAPK6* y considerando las observaciones reportadas por Hernández-Mata et al., (2010) donde los OG disminuyen la LRP y aumentan el NRL en plántulas silvestres de *A. thaliana*, se planteó la pregunta si los OGs podrían alterar la arquitectura radicular activando a la cascada MAPK a través de la cinasa MAPK6. Para observar el efecto de los OGs sobre la arquitectura radicular de las plántulas silvestres Col-0, líneas de sobre-expresión OvMAPK6 y las *mapk6* fueron sembradas en medio MS 1X, suplementado con 0 y 10 ng/ml de OGs. Como se observa en la Fig. 12 A, la adición de 10 ng/ml de OGs disminuye la LRP en plántulas Wt, lo que concuerda con lo observado por Hernández-Mata et al., (2010). Sin embargo, en el NRL no se observó

ningún incremento. En las líneas OvMAPK6 los OGs parecen no afectar la arquitectura radicular (Fig. 12). Mientras que en la mutante *mapk6* los OGs tienden a restablecer el NRL, previamente disminuido por el cambio genético realizado (Fig. 12B). También se analizó la DRL observándose un aumento tanto en las plántulas OvMAPK6 y *mapk6* por efecto de los OGs (Fig. 12 C). Los resultados muestran que la falta de la cinasa MAPK6 disminuye el NRL, DRL y que la adición de los OGs los incrementan, sugiriendo que la cinasa MAPK6 juega un papel fundamental en la arquitectura radicular en plántulas de *A. thaliana* y que los OGs ejercen un efecto estimulador en la inducción de las raíces laterales. En la (Fig. 13), se presentan las fotografías representativas de dichas plántulas.

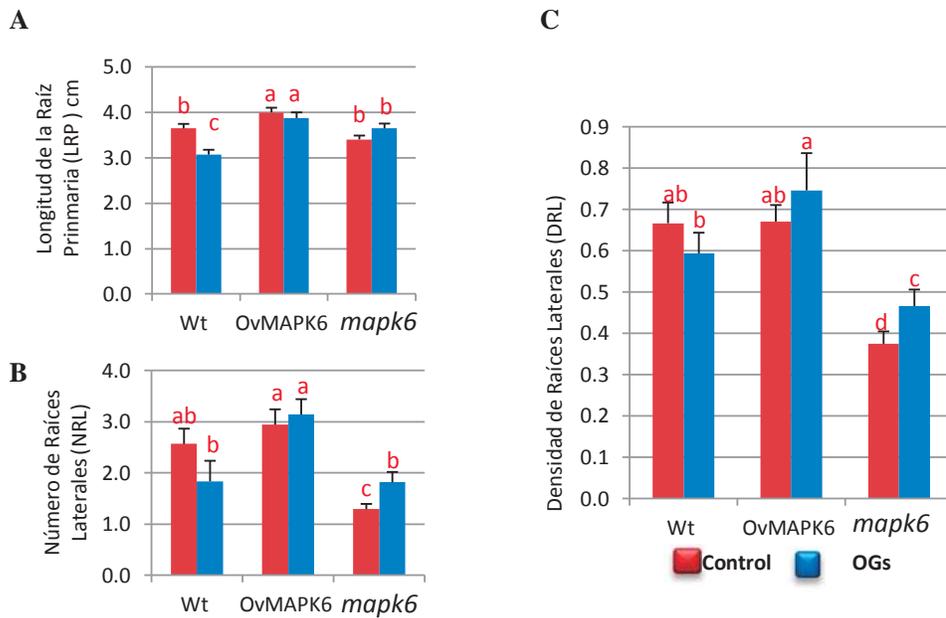


Figura 12. Arquitectura radicular de plántulas de *A. thaliana* Wt, *mapk6* y OvMAPK6 tratadas con 10 ng/ml de OGs. Las semillas fueron sembradas en medio MS 1X, 1% de sacarosa y evaluadas a los 13 días de edad. A) Longitud de la raíz primaria. B) Número de raíces laterales C) Densidad de raíces laterales. Los valores son el promedio de 30 plántulas de dos experimentos independientes ($P < 0.05$). Las letras indican diferencia estadística obtenida por un análisis de varianza (ANOVA).

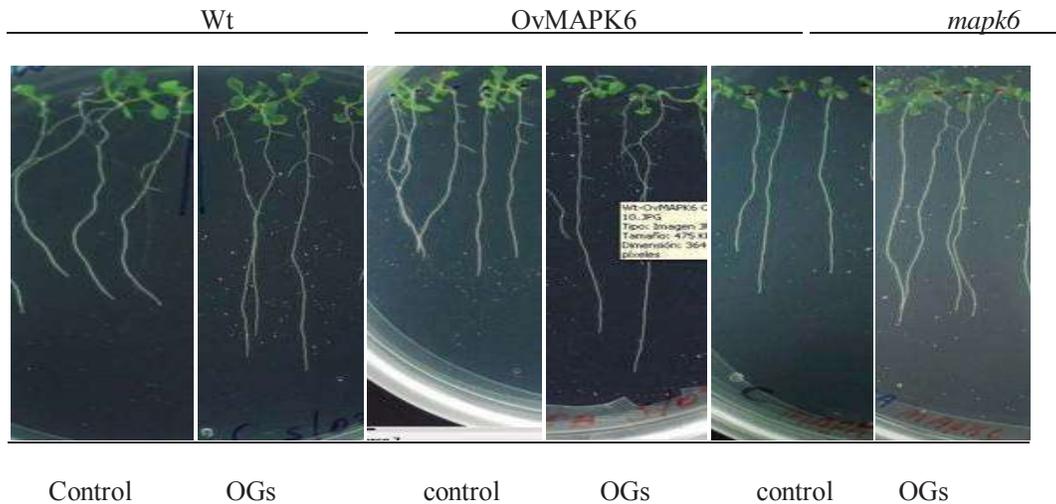


Figura 13. Efecto de los oligogalacturónidos sobre el desarrollo de plántulas modificadas en el gen *AtMAPK6*. Foto representativa de plántulas Wt, *mapk6* y OvMAPK6 crecidas durante 13 días en medio MS 1X, 1% de sacarosa, suplementados con 0 y 10 ng/ml OGs. Las raíces laterales en este medio son muy pequeñas por tal razón en la mutante no se alcanzan a distinguir a simple vista.

5.4 Efecto de los OGs en las líneas de sobre y baja expresión de *AtMAPK3* en *A. thaliana*.

Debido a que varios autores han reportado que ambas cinasas MAPK3/MAPK6 están involucradas en la respuesta al ataque de patógenos (Asai et al., 2002; Hashimoto et al., 2006; Ren et al., 2008; Wang et al., 2007) en este estudio además de analizar la arquitectura radicular de plántulas de sobre-expresión OvMAPK6 y de la mutante *mapk6*, también se analizó el efecto que ejercen los OGs sobre la arquitectura radicular de plántulas de sobre y baja expresión para el gen *MAPK3* de *A. thaliana*. Para ello, las semillas fueron sembradas en medio MS 1X, 1% de sacarosa suplementado con 0 y 10 ng/ml OGs e incubadas por 13 días. Transcurrido ese tiempo se evaluaron la LRP, NRL y la DRL y como se puede observar en la (Fig. 14), las plántulas OvMAPK3 y RNAiMAPK3 incrementaron en todos los parámetros de la arquitectura radicular y además no observamos ningún efecto por la adición de los OGs. En la (Fig. 15) se puede visualizar la foto representativa de las plántulas Col-0, OvMAPK3 y RNAiMAPK3 con y sin OGs. Sin embargo, lo intrigante es que se presenta el mismo tipo de efecto estimulador en ambas líneas (OvMAPK3 y RNAiMAPK3) y no el contrastante como se esperaba. Por lo que a continuación se analizó si efectivamente las líneas utilizadas presentan una sobre y baja expresión del gen *AtMAPK3*.

5.5 Efecto de los OGs sobre la expresión de los transcritos *AtMAPK3* y *AtMAPK6* en las diferentes líneas de *A. thaliana*.

Los resultados antes observados sugieren que las cinasas *AtMAPK3/AtMAPK6* participan en el desarrollo de la planta ya que al sobre-expresar o disminuir al gen *AtMAPK3* aumenta tanto la LRP como en el NRL y al no estar presente el gen *AtMAPK6* disminuye el NRL con respecto a la WT. Sin embargo los OGs parecen afectar solamente a las plántulas mutantes *mapk6*. Por lo anterior, se decidió analizar la expresión de los transcritos de *AtMAPK3* y *AtMAPK6* tanto para las líneas de sobre y baja expresión de los genes *MAPK3/MAPK6* y debido a lo reportado por Mizoguchi et al., (1996), donde determinaron que los niveles de los transcritos de *MEKK1*, *MAPK3* y *S6K* incrementaron simultáneamente cuando las plantas fueron expuestas a temperaturas bajas y a estrés salino, lo que sugirió que las proteínas involucradas en varias rutas de transducción de señales, pueden estar reguladas a nivel transcripcional. La (Fig. 16) se muestra por el análisis del RT-PCR que la expresión del gen *AtMAPK3* en plántulas Wt disminuye ligeramente mientras que en la línea RNAiMAPK3 no fue afectada por la presencia de los OGs. Sin embargo, en las plántulas OvMAPK3, OvMAPK6 y *mapk6* observamos un ligero aumento en la expresión cuando fueron tratadas con los OGs. También se encontró que el transcrito de *AtMAPK3* es mayor en las líneas de sobre-expresión OvMAPK6 y en las mutantes *mapk6* respecto a Col-0 y que la línea OvMAPK3 no presentó ninguna sobre-expresión de dicho gen. Lo anterior indicó que no se tenía una línea de sobre-expresión del gen *AtMAPK3*, mientras que en las plántulas RNAiMAPK3 el nivel de transcrito disminuyó como se esperaba. Lo anterior explica porqué no se observó un efecto contrastante entre las líneas OvMAPK3 y RNAiMAPK3 (Fig. 14).

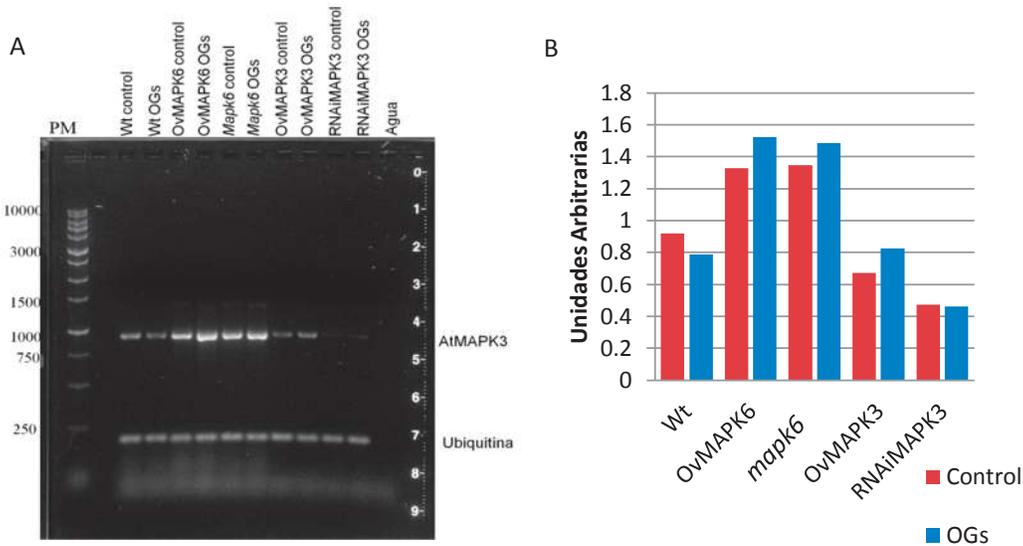


Figura 16. Expresión de *AtMAPK3* por efecto de los OGs. A) Análisis de la expresión génica por RT-PCR del gen *AtMAPK3* el cual tiene un peso molecular de 900 pb. Las plántulas de *A. thaliana* fueron crecidas en medio con 0 y 10 ng/ml de OGs durante 13 días. La ubiquitina se utilizó como control de carga y el agua como control negativo. B) Análisis densitométrico que muestra de forma cuantitativa lo observado en la Fig. 16 A (n=3).

También se analizó el nivel de transcrito para el gen *AtMAPK6* en las distintas líneas de *A. thaliana*, esto para observar si existe una co-expresión entre ambas cinasas MAPK3/MAPK6. Como se observa en la (Fig. 17), los OGs no aumentaron la expresión de *AtMAPK6* en plántulas silvestres, OvMAPK6 y RNAiMAPK3. La mutante *mapk6* como se esperaba no amplificó el transcrito. Lo anterior indica que el gen *AtMAPK6* no es compensado en las líneas de baja de expresión de *AtMAPK3*, a diferencia de lo que se observa en la (Fig. 16), donde en las líneas *mapk6* se incrementa la expresión del gen *AtMAPK3*. Lo antes mencionado sugiere que el aumento en la línea *mapk6* de la expresión de *AtMAPK3* podría participar en el restablecimiento del NRL por efecto de los OGs (Fig. 12).

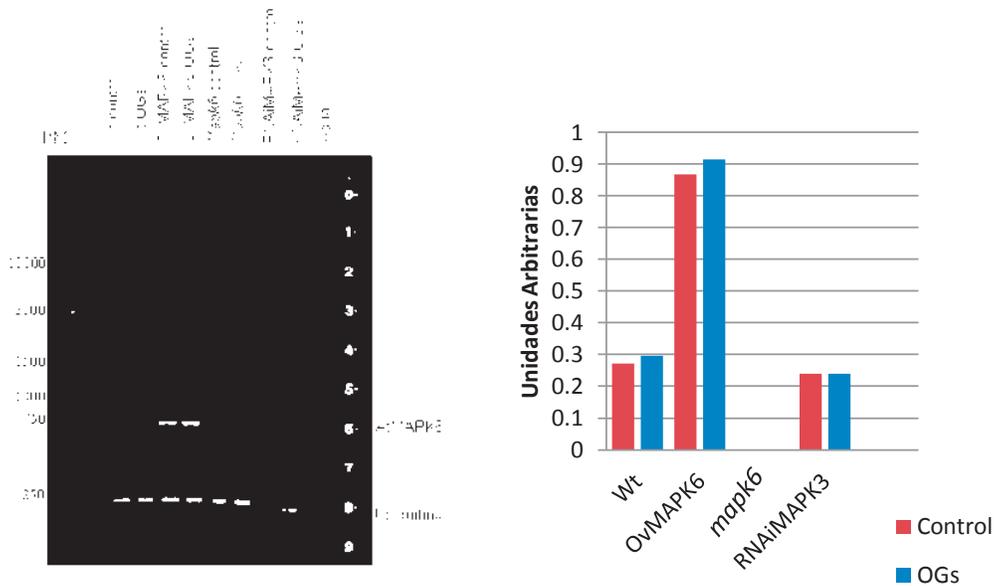


Figura 17. Expresión de *AtMAPK6* por efecto de los OGs. A) El análisis se realizó por RT-PCR, las plántulas fueron crecidas en medio MS 1X suplementadas con O y 10ng/ml de OGs durante 13 días. El transcrito de *AtMAPK6* presenta un peso molecular de 720 pb y 203 pb para *ubiquitina*. *Ubiquitina* fue utilizada como control de carga y el agua como control negativo B) Análisis densitométrico que muestra de forma cuantitativa la expresión genética observada en la Fig. 17 A (n=3).

5.6 Acumulación de camalexina y expresión de *PAD3* por efecto de los oligogalacturónidos.

Como se menciono antes, la camalexina (fitoalexina de *A. thaliana*) es producida tras el ataque de patógenos tales como *Pseudomonas syringae*, *Alternaria brassicicola*, *Cochliobolus carbonum* y *Botrytis cinerea* y que la producción se da después de la activación de la vía MAPK (Glazebrook et al., 1997; Ren et al., 2008; Thomma et al., 1999; Tsuji et al., 1992). Hernández-Mata et al., (2010) reportaron la acumulación de camalexina y aumento del transcrito de *PAD3* por la presencia de 10 ng/ml de OGs en plantas adultas Col-0 de *A. thaliana*. Por lo anterior se investigó la producción de camalexina en plantas adultas por efecto de los OGs en líneas de baja expresión y KO para los genes *AtMAPK3/AtMAPK6* (*RNAiMAPK3* y *mapk6* respectivamente) y analizar el nivel de transcrito de la enzima inmediata a la camalexina, *PAD3*. Para determinar el efecto de los OGs sobre la producción de camalexina, la extracción y cuantificación de camalexina fue realizada en plantas adultas, por el método descrito por Glazebrook y Ausubel, (1994). La cantidad de camalexina fue calculada mediante la interpolación en una curva estándar elaborada con diferentes concentraciones de camalexina pura disuelta en 2 ml de metanol puro. Se midió la absorbancia en un espectrofluorómetro

Shimadzu RF 5000U a 315 nm excitación y 385 nm de emisión. En la Fig. 18 se muestra la curva estándar, representando la absorbencia en el eje de la “Y” y la concentración de camalexina en las “X”.

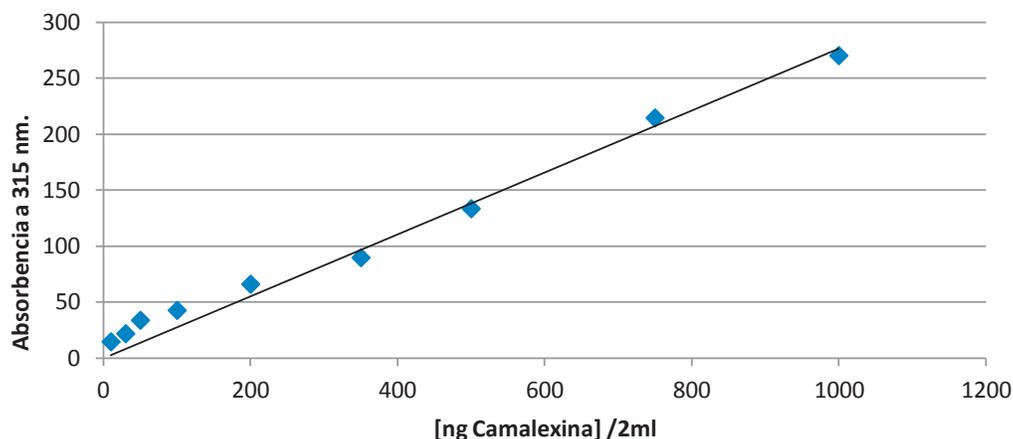


Figura 18. Curva estándar de camalexina pura. Medición realizada por triplicado, el valor de la pendiente fue de 0.277. Los puntos se tomaron con el promedio de tres repeticiones.

Las plántulas de 13 días de edad fueron transplantadas a suelo donde se crecieron durante cuatro semanas. Transcurrido ese tiempo se asperjó la roseta con un mililitro de OGs (0 y 10 ng/ml) y se dejó actuar por 24 h. Cabe mencionar que en este experimento se utilizaron OGs liofilizados y no liofilizados para determinar si el proceso de liofilización preserva su acción biológica. Después de las 24 h, se tomaron aproximadamente 24 mg de tejido y se procedió con la técnica reportada por Glazebrook y Ausubel, (1994).

Se realizaron tres repeticiones de cada una de las líneas de *A. thaliana*. Los resultados obtenidos se pueden observar en la (Fig. 19), donde se muestra un aumento de camalexina en las plantas Wt por el tratamiento con ambas mezclas de OGs. Mientras que en las líneas *mapk6* y RNAiMAPK3 no se observó incremento en la acumulación de camalexina por efecto de los OGs.

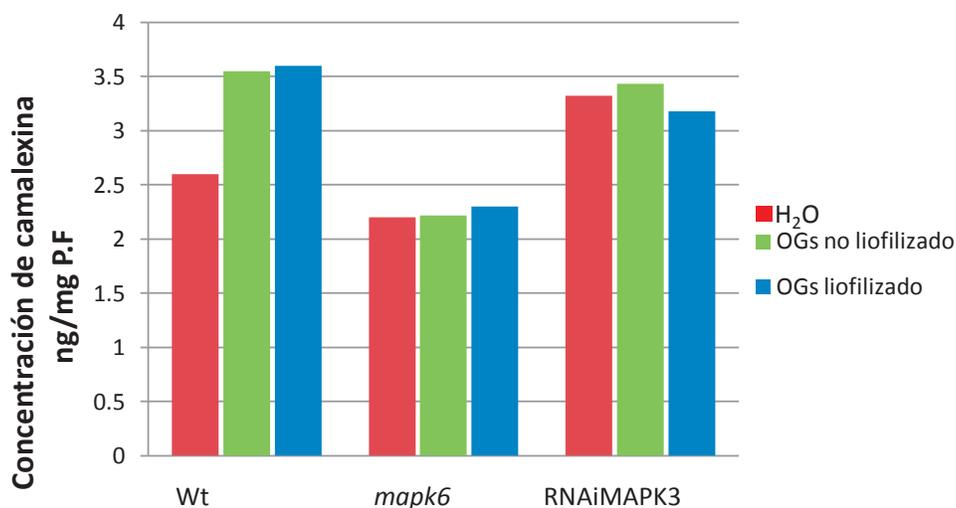


Figura 19. Efecto de los OGs sobre la acumulación de camalexina en plantas adultas. La extracción y cuantificación de camalexina se realizó por el método descrito por Glazebrook y Ausubel, (1994). Las plantas fueron crecidas durante 4 semanas en suelo, posteriormente las hojas de roseta se asperjaron con 1ml de 0 y 10 ng de OGs y se dejaron actuar por 24 h.

Al parecer los OGs liofilizados y no liofilizados mantienen su actividad biológica ya que la acumulación de camalexina en plantas Wt (Col 0) de 4 semanas de edad aumentó de igual forma con los dos tratamientos. Para analizar si la acumulación de camalexina en las diferentes líneas estaría relacionada con el nivel de transcrito de *PAD3*, realizamos un análisis de RT-PCR. En la (Fig. 20), se muestra que la expresión de *PAD3* incrementó en plantas silvestres tratadas con OGs así como también en la línea RNAiMAPK3. Mientras que en las plantas mutantes *mapk6*, disminuyó el nivel de transcrito en presencia de los OGs. En los resultados antes mencionados existe una correlación entre el nivel de transcrito *PAD3* para la Wt, con la producción de camalexina. Mientras que en las líneas RNAiMAPK3 y *mapk6* no se observó tal correlación.

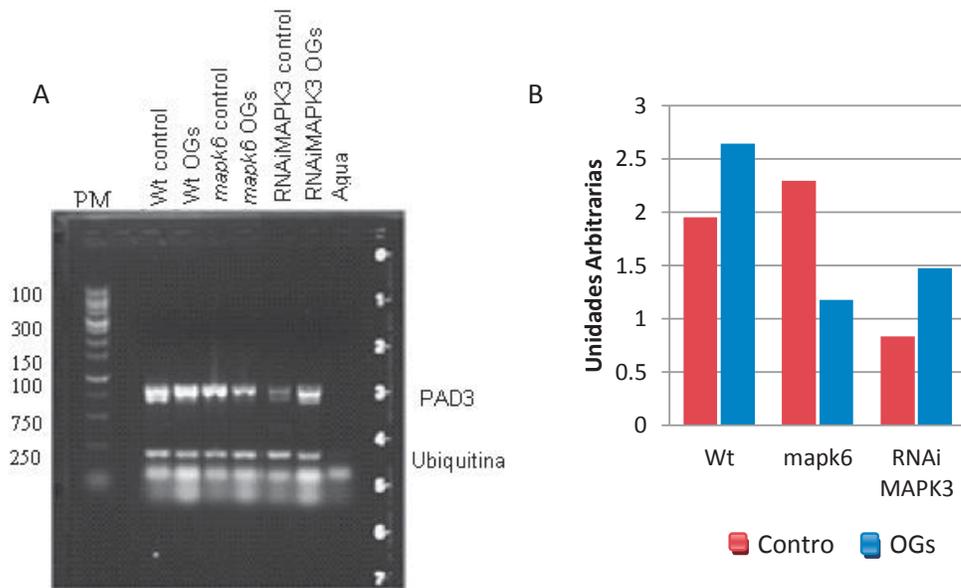


Figura 20. Nivel de expresión de *PAD3* en plantas adultas. A) Análisis de RT-PCR en un gel de agarosa al 1% que muestra la amplificación del gen *PAD3* con un peso de 716 pb, utilizando líneas modificadas en *MAPK6* y *MAPK3* se observa el efecto que ejercen los OGs sobre la acumulación de camalexina. La ubiquitina se utilizó como control de carga y el agua como control negativo. B) representa el análisis densitométrico (n=1).

VI. DISCUSIÓN

Las respuestas relacionadas con defensa en plantas son estimuladas por moléculas conocidas como elicitores. Un gran número de reportes han mostrado que los OGs, una clase de compuestos derivados de la hidrólisis enzimática de la pared celular durante la interacción planta-microorganismo actúan como estimuladores endógenos de defensa o DAMPs y algunos actúan como señales en el desarrollo y crecimiento de la planta (Boller y Felix, 2009; Ferrari et al., 2008; Ridley et al., 2001). Los reportes sobre las observaciones del efecto inhibitorio en el crecimiento vegetal por este tipo de estimuladores, han despertado un gran interés por dilucidar el mecanismo a través del cual un estímulo que señala un ataque por patógenos potenciales, puede alterar el crecimiento y desarrollo de las plantas (Billincampi et al., 1993; Cabrera et al., 2003; Hernández et al., 2006). En plantas, la señalización a través de la cascada de MAP cinasas da lugar a un amplio número de respuestas celulares que incluyen la división y diferenciación celular, así como respuesta a estrés abiótico o biótico (Mishra et al., 2006). Numerosos estudios han mostrado que la cascada de la proteína cinasa MAPK de plantas puede estar regulada a nivel de la transcripción, traducción y post-traducción de las cinasas que la componen (Mishra et al., 2006; Pitzschke y Hirt, 2006; Zhang et al., 2006). Las cinasas MAPK3, MAPK4 y MAPK6 son las más estudiadas y está documentado que la cascada MAPK juega un papel importante en la inmunidad innata y a respuestas de estrés del medio ambiente y algunas han sido involucradas en la regulación del desarrollo y crecimiento de la planta. Con la finalidad de determinar el mecanismo por el cual los OGs modifican el crecimiento y desarrollo, así como también la defensa de las plantas, en el presente estudio se ensayaron líneas transgénicas de *A. thaliana* de sobre-expresión de MAPK6, MAPK3, una de baja expresión en MAPK3 y una mutante en MAPK6. Al comenzar este trabajo se aseguró que efectivamente se contaba con una línea KO en AtMAPK6 (Fig. 11) y una vez corroborado tal hecho, se procedió a evaluar y analizar el sistema radicular en las líneas de estudio.

6.1 Análisis del sistema radicular de las líneas OvMAPK6 y *mapk6* de *A. thaliana*.

Los resultados obtenidos mostraron que la pérdida de función del gen *AtMAPK6* promovió un fenotipo diferente a la silvestre (Fig. 11), donde el NRL en la mutante *mapk6* disminuyó considerablemente respecto a la Wt. Lo anterior sugiere que MAPK6

está involucrada en el desarrollo de la arquitectura radicular. Algunos autores como Müller et al., (2010), evaluaron líneas mutantes homocigotas *mapk6-2*, observando un acortamiento de la raíz primaria y una disminución en el NRL. Bush y Krysan, (2007) reportaron que la línea mutante en la MAPK6 redujo la fertilidad y recientemente Wang et al., (2010) también reportaron que la cinasa MAPK6 regula el NRL de *A. thaliana* a través de la producción de óxido nítrico. Para el caso de líneas de sobre-expresión OvMAPK3 y baja expresión el fenotipo encontrado fue similar en ambas líneas, debido a que la línea OvMAPK3 perdió el efecto de sobre-expresar el gen AtMAPK3 (Fig. 16) y esto impidió observar un efecto contrastante.

6.2 Efecto de los OGs sobre la arquitectura radicular en Wt, OvMAPK3, RNAiMAPK6, OvMAPK6 y *mapk6* de *A. thaliana*.

Un gran número de estudios han involucrado la participación conjunta en el desarrollo de las cinasa MAPK3 y MAPK6 tal como Wang et al., (2007) donde reportaron que las dos cinasas participan en el desarrollo estomático y en la abscisión de órganos florales. Sin embargo, algunos autores han reportado que únicamente la cinasa MAPK6 está implicada en procesos de desarrollo del embrión (Bush y Krysan, 2007) y en la regulación y tamaño del NRL. En el presente trabajo también se encontró que la cinasa MAPK6 está involucrada en el desarrollo de la planta, ya que en el análisis de una línea *mapk6*, el fenotipo radicular específicamente en el NRL disminuyó respecto a la línea silvestre Col-0. Habiendo observado el efecto antes mencionado, se planteó si la adición de una mezcla de OGs a las plántulas podría alterar el desarrollo radicular. Los resultados obtenidos muestran que 10 ng/ml de OGs acortaron la longitud de la raíz primaria en plántulas silvestres (Fig. 12) y estimulan ligeramente el NRL en la mutante *mapk6* restableciendo el efecto producido por la pérdida de función de AtMAPK6 (Fig. 12 B). Una posible explicación a este fenómeno podría ser que los OGs estuviesen activando a la otra cinasa MAPK3, la cual entonces estaría implicada en el desarrollo del NRL, ya que se observó un ligero incremento en el nivel de expresión de AtMAPK3 en líneas OvMAPK6 y *mapk6* (Fig. 16 B). Previamente Hernández-Mata et al., (2010) reportaron que en plántulas de *A. thaliana* Col-0, 10 ng/ml de OGs acortaron la LRP y estimularon el desarrollo de las raíces laterales, lo cual difiere con nuestros resultados, esto podría deberse a la diferencia de medios utilizados (aquí se ensayó el medio MS 1X suplementado con 0.8 g de Gelrite, mientras que los autores antes mencionados

crecieron el material vegetal en medio MS 0.2X con 0.8 g de fitoagar). Algunos autores han reportado que 10-15 mg/l de OGs que se obtienen a partir de la pectina cítrica, la cual se caracteriza por presentar un grupo carboxílico terminal que define su grado de polimerización entre 7 y 16, estimulan el desarrollo de hojas y raíces de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) proponiendo así el empleo de una mezcla de OGs como posible fuente de sustitución auxínica (Suarez y Hernández, 2008). Por los resultados encontrados donde los OGs restablecen el NRL en *mapk6*, se propone que la cinasa MAPK3 podría ser inducida por los OGs.

6.3 Efecto de los OGs sobre la expresión de los genes MAPK3 y MAPK6 en plántulas Wt, OvMAPK3, RNAiMAPK3, OvMAPK6 y *mapk6* de *A. thaliana*.

Se analizó el nivel de expresión de los genes *AtMAPK6* y *AtMAPK3* debido a que en otros estudios como el de Mizoguchi et al., (1996), determinaron que la expresión de los transcritos de *MEKK1*, *MAPK3* y *S6K* incrementaron simultáneamente cuando las plantas fueron expuestas a temperaturas bajas y a estrés salino, lo cual sugirió que las proteínas involucradas en varias rutas de transducción de señales, pueden ser reguladas a nivel transcripcional. Por otra parte, Rudd et al., (2008) mostraron que los genes *MAPK3* y *MAPK6* de trigo participaban en la respuesta a estrés biótico incrementando su nivel de expresión dependiendo del tiempo de interacción entre el patógeno y el huésped.

Lo anterior sugería que al haber daño en la planta los genes *MAPK3/MAPK6* se sobre expresaban para contrarrestar dicho efecto. Los resultados obtenidos en el presente trabajo con relación a la expresión de genes indicaron que 10 ng/ml de OGs incrementaron ligeramente la expresión de *AtMAPK3* en plántulas *OvMAPK6* y *mapk6* (Fig. 16), no siendo así para el gen *AtMAPK6* en plántulas de *RNAiMAPK3* (Fig. 17). Estos resultados en donde existe una mayor expresión de *AtMAPK3*, sugieren que podrían estar relacionados con la estimulación del NRL en plántulas mutantes *mapk6* por efecto de OGs. Si bien existen reportes en donde mencionan la posible participación de MAPK3 por la ausencia de MAPK6, tal como lo reportado por López-Bucio (2009), donde realizó ensayos de tipo Northern blot para analizar los cambios en la acumulación del transcrito de MAPK3 en plantas silvestres y mutantes *mapk6*. Los resultados mostraron que en las primeras, la expresión del gen *MAPK3* fue reprimida por ABA y glucosa desde tiempos cortos (1.5 h). Por otra parte, en la mutante *mapk6*, la expresión

del gen *MAPK3* continuó reprimida por ABA a las 3 h, pero interesantemente al mismo tiempo de tratamiento tal expresión fue inducida por glucosa a niveles mayores que con el manitol. Estos resultados sugirieron que tal inducibilidad fue independiente del efecto osmótico.

Sin embargo, en el presente trabajo el nivel de expresión del *MAPK3* no aumentó en forma significativa, lo que sugiere que el efecto producido podría ser por la activación de dicha cinasa y no por su síntesis. Lo anterior coincidiría con lo reportado por Samaj et al., (2002) donde la cantidad de proteína de la cinasa SIMK de tabaco presente en una línea Wt respecto a una de sobre expresión no fue directamente proporcional a la actividad de dicha proteína. En este experimento se pudo apreciar que el nivel de expresión de *AtMAPK3* en plántulas *OvMAPK3* no fue mayor que la Col-0 (Fig. 16), lo que indica que no se cuenta con una línea de sobre-expresión y por lo tanto no se ensayo está línea en nuestros siguientes experimentos.

6.4 Efecto de OGs sobre la acumulación de camalexina en plántulas Wt, RNAiMAPK3, OvMAPk6 y *mapk6* de *A. thaliana*.

También está ampliamente reportado en la literatura que la cascada de las proteínas cinasas MAPK, está involucrada en la activación de genes relacionados a respuestas de defensa como son las fitoalexinas. Estos últimos son compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular que son sintetizadas en respuesta al ataque de patógenos. La fitoalexina, camalexina que es producida por *Arabidopsis* en respuesta a la infección por la bacteria patógena *Pseudomonas syringae* (Zhou et al., 1999). En el presente estudio se encontró que 10 ng/ml de OGs liofilizados y no liofilizados con un grado de polimerización de 6 a 13 residuos, incrementó la síntesis de camalexina en plantas adultas de 4 semanas de edad 24 h después del tratamiento (Fig. 19), así como el nivel de expresión de PAD3 (Fig. 20); al igual por lo reportado por Hernández-Mata et al., (2010) donde en *A. thaliana* Col-0, la expresión de PAD3 y la acumulación de camalexina en plántulas y plantas adultas se incremento por efecto de los OGs. Por otra parte, en las líneas RNAiMAPK3 y *mapk6* no se presento ningún efecto de los OGs sobre la síntesis de camalexina, respecto al control (Fig. 19). Investigaciones previas han involucrado a las proteínas cinasas MAPK3/MAPk6 en la activación de genes relacionados a la biosíntesis de camalexina por el ataque de *Botrytis cinerea*. Ren et al., (2008) reportaron que la infección por el hongo en *A. thaliana* activó la cascada

MAPKKK/MEKK1-MKK4/MKK5-MAPK3/MAPK6 lo que llevo a una regulación rápida y coordinada de múltiples genes que codifican para enzimas que participan en la ruta biosintética del triptófano y de la camalexina, activando a la enzima PAD3 (que convierte el IAOx a camalexina). Otro ejemplo, es el reportado por Xu et al., (2008), donde un estrés salino en *A. thaliana* activo a la doble cinasa MAPKK9, la cual fosforiló río abajo a las proteínas MAPK3/MAPK6; esto último provocó la transcripción de múltiples genes relacionados a la biosíntesis de etileno y de camalexina. Sin embargo, un reporte reciente mostró que las cinasas MPK3 y MPK6 juegan papeles diferentes en la resistencia basal inducida por elicitores como OGs y flg22, cuando se provoca la infección con *B. cinerea*. El análisis de mutantes MAPK (*mpk3-1* y *mapk6-2*) reveló que la falta de MPK3 aumentó la susceptibilidad basal a los hongos, pero no afectó significativamente la resistencia inducida por elicitores. En cambio la ausencia de MPK6 no mostró ningún efecto sobre la resistencia basal, pero suprimió la resistencia inducida por OGs y flg22 a *B. cinerea* (Galletti et al., 2011). Por lo anterior se concluye que los OGs son capaces de regular respuestas de defensa a través de la vía MAPK involucrando directamente a las cinasas MAPK3/MAK6.

VII. CONCLUSIÓN

La mezcla de oligogalacturónidos (OGs) alteró el desarrollo de la arquitectura radicular y estimuló la síntesis de camalexina en plántulas de *A. thaliana* a través de la activación de las cinasas MAPK3 y MAPK6

VIII. PERSPECTIVAS

1. Ensayar una nueva línea de sobre expresión de *AtMAPK3*, ya que al parecer la estudiada en el presente trabajo perdió su capacidad de sobre-expresión.
2. Estudiar una línea mutante en *AtMAPK3*
3. Evaluar la respuesta de los OGs sobre una línea mutante *mapk4*, debido a que esta cinasa está involucrada en la activación del factor de transcripción WRKY33 el cual permite la transcripción del gen PAD3.
4. Analizar el nivel de activación de *AtMAPK3/AtMAPK6* mediante un ensayo de cinasa.

IX BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal M., Sahi C., Katar-agarwal S., Agarwal S., Young T., Gallie D.R., Sharma V.M., Ganesan K. and Grover A. 2003. Molecular characterization of rice hsp101: complementation of yeast hsp104 mutation by disaggregation of protein granules and differential expression in indica and japonica rice types. *Plant Mol. Biol.* 51: 543-553.
- Aguilar C. N., de la Luz R. M., de la Garza H. y Contreras E. C. J. 1999. Aspectos bioquímicos de la relación entre el escaldado TB-TL y la textura de vegetales procesados. *J. Mex. Chem. Soc.* 43:54-62.
- Alvarez M. E., Pennell R. I., Meijer P. J., Ishikawa A., Dixon R. A. and Lamb C. 1998. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92: 773-784.
- Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M. R., Chiu W. L., Gomez-Gomez L., Boller T., Ausubel F. M. and Sheen J. 2002. MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* 415:977-983.
- Balandrán-Quintana R. R., Mendoza-Wilson A. M., Alvarez-Manilla G., Bergmann C. W., Vargas-Arispuro I. and Martínez-Téllez M. A. 2002. Effect of pectic oligomers on physiological responses of chilling injury in discs excised from zucchini (*Cucurbita pepo* L.). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290:577-584.
- Beeckman T., Burssens S. and Inze D. 2001. The peri-cell-cycle in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 52: 403-411.
- Bellincampi D., Cardarelli M., Zaghi D., Serino G., Salvi G., Gatz C., Cervone F., Altamura M. M., Costantino P. and De Lorenzo G. 1996. Oligogalacturonidos prevent rhizogenesis in rolB transformed tobacco explants by inhibiting auxin-induced expression of the rolB gene. *Plant Cell* 8: 477-487.
- Bellincampi D., Dipierro N., Salvi G., Cervone F. and De Lorenzo G. 2000. Extracellular H₂O₂ induced by oligogalacturonidos is not involved in the inhibition of the auxin- regulated rolb gene expression in tobacco leaf explants. *Plant Physiol.* 122: 1379-1385.

- Bellincampi D., Salvi G., De Lorenzo G., Cervone F., Marfa V., Eberhard S., Darvill A. and Albersheim P. 1993. Oligogalacturónidos inhibit the formation of roots on tobacco explants. *Plant J.* 4: 207–213.
- Bent A. F. 2000. *Arabidopsis* in planta transformation. uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species. *Plant Physiol.* 124: 1540-1547.
- Binet M. N., Bourque S., Lebrun-Garcia A., Chiltz A. and Pugin A. 1998. Comparison of the effects of cryptogein and oligogalacturónidos on tobacco cells and evidence of different forms of desensitization induced by these elicitors. *Plant Sci.* 137: 33-41.
- Bishop P.D., Makus D.J., Pearce G. and Ryan C.A. 1981. Proteinase inhibitor-inducing factor activity in tomato leaves resides in oligosaccharides enzymatically released from cell walls. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 3536–3540.
- Boller T. and Felix G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Ann. Rev. Plant Biol.* 60: 379-406.
- Boller T. and He S. Y. 2009. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* 324:742-744.
- Böttcher C., Westphal L., Schmotz C., Prade E., Scheel D. and Glawischnig E. 2009. The multifunctional enzyme CYP71B15 (PHYTOALEXIN DEFICIENT3) converts cysteine-indole-3-acetonitrile to camalexin in the indole-3-acetonitrile metabolic network of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 21:1830-1845.
- Branca C., De Lorenzo G. and Cervone F. 1988. Competitive inhibition of the auxin-induced elongation by α -D-oligogalacturónidos in pea stem segments. *Physiol. Plant.* 72:499-504.
- Brecht J.K. and Huber D.J. 1988. Products released from enzymically active cell wall stimulate ethylene production and ripening in preclimacteric tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit. *Plant Physiol.* 88:1037-1041.
- Brodersen P., Petersen M., Nielsen H. B., Zhu S., Newman M. A., Shokat K. M., Rietz S., Parker J. and Mundy J. 2006. *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates salicylic acid-

- and jasmonic acid/ethylenedependent responses via EDS1 and PAD4. *Plant J.* 47: 532–546.
- Bush S. M. and Krysan P. J. 2007. Mutational evidence that the *Arabidopsis* MAP kinase MPK6 is involved in anther, inflorescence, and embryo development. *J. Exp. Bot.* 58: 2181-2191.
- Burton R. A., Gidley M. J. and Fincher G. B. 2010. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nat. Rev. Chem. Biol.* 6:724-732.
- Cabrera J. C., Gómez R., Diosdado E., Hormaza J. V., Iglesias R., Gutiérrez A. E. y González S. J. 2003. Procedimiento de obtención de una mezcla de oligosacáridos pécticos estimuladora del enraizamiento vegetal. OCPI Cuba. Certificado No. 22 859.
- Cabrera J. C., Boland A., Messiaen J., Cambier P. and Van Cutsem P. 2008. Egg box conformation of oligogalacturónidos: The time-dependent stabilization of the elicitor-active conformation increases its biological activity. *Glycobiol.* 18:473-482.
- Cano H., Zavala G., Soriano E. y López-Romero E. 1994. Oligosacáridos de origen fúngico y vegetal inducen una cinética similar de acumulación de faseolina en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris L.*). *Rev. Mex. Fitopatol.* 12: 163-173.
- Campbell A. D. and Labavitch J. M. 1991. Induction and regulation of ethylene biosynthesis by pectic oligomers in cultured pear cells. *Plant Physiol.* 97:699-705.
- Carpita N. C. and Gibeaut D. M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3: 1-30.
- Casimiro I., Marchant A., Bhalerao R. P., Beeckman T., Dhooge S., Swarup R., Graham N., Inze D., Sandberg G., Casero P. J. and Bennett M. 2001. Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* 13: 843-852.
- Casimiro I., Beeckman T., Graham N., Bhalerao R., Zhang H., Casero P., Sandberg G. and Bennett M. J. 2003. Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends Plant Sci.* 8: 165-171.
- Casson S. A. and Lindsey K. 2003. Tansley Review: Genes and signalling in root development. *New Phytol.* 158: 11-38.

- Chilton M. D. 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11: 263-271.
- Chisholm S. T., Coaker G., Day B. and Staskawicz B. J. 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124: 803-14.
- Cosgrove D. J. 1997. Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 171-201.
- Cosgrove D. J. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:850-861.
- Côté F., Ham K. S., Hahn M. G. and Bergman C. W. 1998. Oligosaccharide elicitors in host-pathogen interactions: Generation, perception, and signal transduction. *Subcell. Biochem.* 29:385-432
- Dangl J. L. and Jones J. D. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature.* 411: 826-833.
- Davis K. R., Darvill A. G., Albersheim P. and Dell A. 1986. Host-pathogen interactions: XXIX. Oligogalacturonides released from sodium polypectate by endopolygalacturonic acid lyase are elicitors of phytoalexins in soybean. *Plant Physiol.* 80:568-577.
- Davis K. R. and Hahlbrock K. 1987. Induction of defense responses in cultured parsley cells by plant cell wall fragments. *Plant Physiol.* 85:1286-1290.
- Dempsey D. M. A. and Klessig D. F. 1994. Salicylic acid, active oxygen species and systemic acquired resistance in plants. *Trends Cell Biol.* 4: 334-338.
- Dixon R.A. 1986. The phytoalexin response: elicitation, signalling and control of host gene expression. *Biol. Rev.* 61:239-291.
- Dubrovsky J. G., Rost T. L., Colón-Carmona A. and Doerner P. 2001 Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 214; 30-36
- Dykxhoorn D. M., Novina C. D. and Sharp P. A. 2003. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 457-467.

- Eberhard S., Doubrava N., Marf V., Mohnen D., Southwick A., Darvill A. and Albersheim P. 1989. Pectic cell wall fragments regulate tobacco thin-cell-layer explants morphogenesis. *Plant Cell* 1:747-755.
- Elbashir S. M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K. and Tuschl T. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-498.
- Enriquez-Guevara E. A., Aispuro-Hernandez E., Vargas-Arispuro I. y Martínez-Téllez M. A. 2010. Oligosacarinas derivadas de pared celular: actividad biológica y participación en la respuesta de defensa de plantas. *Rev. Mex. Fitopatol.* 28:144-155.
- Ferrari S., Galletti R., Pontiggia D., Manfredini C., Lionetti V., Bellincampi D., Cervone F. and De Lorenzo G. 2008. Transgenic expression of a fungal *endo*-polygalacturonase increases plant resistance to pathogens and reduces auxin sensitivity. *Plant Physiol.* 146: 669-681.
- Fukaki H. and Tasaka M. 2009. Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Mol Biol.* 69: 437-449.
- Galletti R., Ferrari S. and De Lorenzo G. 2011. Arabidopsis MPK3 and MPK6 play different roles in basal and oligogalacturonide- or flagellin-induced resistance against *Botrytis cinerea*. *Plants Physiol* 2: 804-814.
- García-Mateos R. y Pérez-Leal R. 2003. Fitoalexinas: mecanismo de defensa de las plantas. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente.* 9: 5-10.
- Gelvin S.B. 2003. Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microb.Mol. Biol. Rev.* 67: 16-37.
- Geydan T. D y Melgarejo L. M. 2006. Plasmodesmos: estructura y función. *Acta Biol. Colomb.* 11: 91-96.
- Glawischnig E. 2007. Camalexin. *Phytochem.* 68: 401–406.
- Glazebrook J. and Ausubel F. M. 1994. Isolation of phitoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interaction with bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8955-8959.

- Glazebrook J., Zook M., Mert F., Kagan I., Rogers E. E., Crute I. R., Holub E. B., Hammerschmidt R. and Ausubel M. F. 1997. Phytoalexin-deficient mutants of arabidopsis reveal that PAD4 encodes a regulatory factor and that four PAD genes contribute to downy mildew resistance. *Gen. Soc. Amer.* 146:381-392.
- Gomathi V. and Gnanamanickam S. S. 2004. Polygalacturonase inhibiting proteins in plant defence. *Curr. Sci.* 87:1211-1217.
- Gust A. A., Biswas R., Lenz H. D., Rauhut T., Ranf S., Kemmerling B., Götz F., Glawischnig E., Lee J., Felix G. and Nürnberger T. 2007. Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 282: 32338–32348.
- Hashimoto M., Negi J., Young J., Israelsson M., Schroeder J. I and Iba K. 2006. Arabidopsis HT1 kinase controls stomatal movements in response to CO₂. *Nat. Cell. Biol.* 8: 391-397.
- Hahn M. G., Darvill A. G. and Albersheim P. 1981. Host-pathogen interactions. XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. *Plant Physiol.* 68: 1161–1169.
- Hématy K., Cherk C. and Somerville S. 2009. Host–pathogen warfare at the plant cell wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12:406-413.
- Hernández A., Vasallo P. M., Torres A. y Salido E. 1994. Análisis del RNA: Estudio de la expresión génica. *Biol. Mol. Nefrol.* 14: 145-162.
- Hernández-Mata G., Beltrán-Peña E. M. y Soriano-Bello E. L. 2007. El crecimiento de la raíz de Arabidopsis thaliana es afectado por un oligogalacturónido estimulador de defensa. *Ciencia Nicolaita.* 49:141-154.
- Hernández-Mata G., Mellado-Rojas M. E., Richards-Lewis A., López-Bucio J., Beltrán-Peña E. and Soriano-Bello E. L. 2010. Plant immunity induced by oligogalacturónidos alters root growth in a process involving flavonoid accumulation in Arabidopsis thaliana. *J. Plant Growth Regul.* 29: 441-454.

- Himanen K., Boucheron E., Vanneste S., de Almeida Engler J., Inze D. and Beeckman T. 2002. Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell* 14: 2339-2351.
- Humphrey T. V., Bonetta D. T. and Goring D. R. 2007. Sentinels at the wall: cell wall receptors and sensors. *New Phytologist*. 176:7-21.
- Iacomini M., Serrato R. V., Sasaki G. L., López L., Buchi D. F. and Gorin P. A. 2005. Isolation and partial characterization of a pectic polysaccharide from the fruit pulp of *Spondias cytherea* and its effect on peritoneal macrophage activation. *Fitoterapia* 76: 676-683.
- Ichimura K., Shinozaki K., Tena G., Sheen J., Henry Y., Champion A., Kreis M., Zhang S., Hirt H., Wilson C., Heberle-Bors E., Ellis B. .E., Morris P. C., Innes R. W., Ecker J. R., Scheel D., Klessig D. F., Machida Y., Mundy J., Ohashi Y. and Walker J. C. 2002. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: A new nomenclature. *Trends Plant Sci.* 7: 301–308.
- Ichimura K., Mizoguchi T., Irie K., Morris P., Giraudat J., Matsumoto K. and Shinozaki K. 1998. Isolation of AtMEKK1 (a MAP kinase kinase kinase)-interacting proteins and analysis of a MAP kinase cascade in *Arabidopsis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253:532–543
- Inngjerdingen K. T., Debes S. C., Inngjerdingen M., Hokputsa S., Harding S. E., Rolstad B., Michaelsen T. E., Diallo D. and Paulsen B. S. 2005. Bioactive pectic polysaccharides from *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC., a Malian medicinal plant, isolation and partial characterization. *J. Ethnopharm.* 101: 204-214.
- Jaillais Y. and Chory J. 2010. Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. *Nat. Struc. Mol. Biol.* 17: 642-645.
- Jones J. D. and Dangl J. L. 2006. The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- Juárez-Domínguez A., Santillán-Mendoza R., Mellado-Rojas M. E. y Beltrán-Peña E. M. 2010. Insulina estimula el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* a través de la cinasa MAPK3. *Biológicas* 12: 14-19.

- Kashyap D. R., Vohra P. K., Chopra S. and Tewari R. 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technol.* 77:215-227.
- Katrine F. B., Petersen K., Petersen M. and Mundy J. 2009. Gene regulation by MAP Kinase cascades. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 615-621.
- Klarzynski O., Plesse B., Joubert J.-M., Yvin J.-C., Kopp M., Kloareg B. and Fritig B. 2000. Linear β -1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiol.* 124: 1027-1038.
- Komae K., Komae A. and Misaki A. 1990. A 4,5-unsaturated low molecular oligogalacturonide as a potent phytoalexin-elicitor isolated from polygalacturonide of *Ficus awkeotsang*. *Agr. Biol. Chem.* 54:1477-1484.
- Kurup S., Runions J., Kohler U., Laplace L., Hodge S. and Haseloff J. 2005. Marking cell lineages in living tissues. *Plant J.* 42: 444-453.
- Lloyd A. 2003. Vector construction for gene overexpression as a tool to elucidate gene function. *Meth. Mol. Biol.* 236: 329-344.
- López-Bucio J., Cruz-Ramírez A., Pérez-Torres A., Ramírez-Pimentel J.G., Sánchez-Calderón L. and Herrera-Estrella L. 2005. Plant Architecture and its manipulation. *Trinbull C. Balchwell publishing/ Annual.* 177: 181-206
- López Bucio J. 2009. Estudio de la participación de las MAPK3 y MAPK6 de *Arabidopsis thaliana* en las vías de señalización de azúcares y ácido abscísico. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Low P. S. and Merida J. R. 1996. The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. *Physiol. Plant.* 96:533–542.
- Lu C., Han M. H., Guevara-Garcia A. and Fedoroff N. V. 2002. Mitogen-activated protein kinase signaling in postgermination arrest of development by abscisic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 15812–15817.
- Maderos Y. y Hormaza J. 2008. Consideraciones generales en la obtención, caracterización e identificación de los oligogalacturónidos. *Cultivos Tropicales.* 29:83-90.

- Malamy J. E. and Benfey P.N. 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124; 33–44
- Mao G., Meng X., Liu Y., Zheng Z., Chen Z. and Zhanga S. 2011. Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 23: 1639–1653.
- Marfa V., Gollin D.J., Eberhard S., Mohnen D., Darvill A. and Albersheim P. 1991. Oligogalacturónidos are able to induce flowers to form on tobacco explants. *Plant J*. 1:217-225.
- Marsch Martínez N., Zúñiga Mayo V. M., Reyes Olalde J. I., Salazar Moya O. R. y de Folter S. 2009. Genómica funcional de plantas: estudio del desarrollo de flores y frutos. *Acta Universitaria* 19: 21-29.
- Mathieu Y. 1996. Involvement of protein phosphorylation in the arly steps of transduction of the oligogalacturonide signal in tobacco cells. *Plant Physiol. Biochem*. 34: 399-408.
- Mauro M. L., De Lorenzo G., Constantino P. and Billincampi D. 2002. Oligogalacturónidos inhibit the induction of late but not of early auxin-responsive genes in tobacco. *Planta* 215: 494-501.
- Messiaen J. and Van Cutsem P. 1994. Pectic signal transduction in carrot cells: Membrane, cytosolic and nuclear responses induced by oligogalacturónidos. *Plant Cell Physiol*. 35:677-689.
- Messiaen J., Read N.D., Van Cutsem P. and Trewavas A.J. 1993. Cell wall oligogalacturónidos increase cytosolic free calcium in carrot protoplasts. *J. Cell Sci*. 104:365-371.
- Meyerowitz E. M. 1994. Pattern formation in plant development: four vignettes. *Curr. Opin. Genet. Dev*. 4: 602-608.
- Miles G. P., Samuel M. A., Zhang Y. and Ellis B. E. 2005. RNA interference-based (RNAi) suppression of AtMAPK6, an *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase, results in hypersensitivity to ozone and misregulation of AtMAPK3. *Environ. Pollut*. 138: 230–237.

- Mishra N.S., Tuteja R. and Tuteja N. 2006. Signaling through MAP kinase networks in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 452: 55-68.
- Mizoguchi T., Irie K., Hirayama T., Hayashida N., Yamaguchi K., Matsumoto K. and Shinozaki K. 1996. A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for mitogen-activated protein kinase and S6 ribosomal protein kinase by touch, cold and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol.* 93: 765-769.
- Moerschbacher B. M., Mierau M., Graebner B., Noll U. and Mort A. J. 1999. Small oligomers of galacturonic acid are endogenous suppressors of disease resistance reactions in wheat leaves. *J. Exp. Bot.* 50:605-612.
- Moloshok T., Pearce G. and Ryan C. A. 1992. Oligouronide signaling of proteinase inhibitor genes in plants: structure activity relationships of di- and trigalacturonic acids and their derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.* 294:731-734.
- Monsoor M. A. 2005. Effect of drying methods on the functional properties of soy hull pectin. *Carbohydrate Polymers* 61:362-367.
- Montiel G., Pascal G., Allemand C. J. and Breton C. 2004. Transcription factor networks. pathways to the knowledge of root development. *Plant Physiol.* 136: 3478-3485.
- Morris E. R., Powell D. A., Gidley M. J. and Rees D. A. 1982. Conformations and interactions of pectins: I. Polymorphism between gel and solid states of calcium polygalacturonate. *J. Biol. Mol.* 155:507-516.
- Müller K. O. and Börger H. 1940. Experimentelle untersuchungen über die *Phytophthora infestans*-resistenz der kartoffel. *Arb. Biol.* 23:189-31.
- Müller J., Beck M., Mettbach U., Komis G., Hause G., Menzel D., and Amaj J. 2010. *Arabidopsis* MPK6 is involved in cell division plane control during early root development, and localizes to the pre-prophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane. *Plant J.* 61: 234-248.

- Napoli C., Lemieux C. and Jorgensen R. 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2: 279-289.
- Norman C., Vidal S, and Palva E. T. 1999. Oligogalacturonide-mediated induction of a gene involved in jasmonic acid synthesis in response to the cell-wall-degrading enzymes of the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Mol. Plant-Microbe Interactions*. 12:640-644.
- Nürnberg T. and Scheel D. 2001. Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci.* 6; 372-379.
- Péret B., Larrieu A. and Bennett M. J. 2009. Lateral root emergence: a difficult birth. *J. Exp. Bot.* 60: 3637-3643.
- Pérez-Almeida I. y Carpita N. C. 2006. Las β -Galactosidasas y la dinámica de la pared celular. *Interciencia* 31: 476-483.
- Petersen M., Brodersen P., Naested H., Andreasson E., Lindhart U., Johansen B., Nielsen HB., Lacy M., Austin M. J., Parker J. E., Sharma S. B., Klessig D. F., Martienssen R., Mattsson O., Jensen A. B., and Mundy J. 2000. Arabidopsis MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* 103: 1111–1120.
- Ping C., Lall S., Nettleton D. and Howell S. H. 2006. Gene expression programs during shoot, root, and callus development in arabidopsis tissue culture. *Plant Physiol.* 141: 620-637
- Pitzschke A. and Hirt, H. 2006. Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling in plants. *Plant Physiol* 141: 351-6.
- Qiu J. L. 2008. Arabidopsis MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *EMBO J.* 27: 2214–2221.
- Qutob D. 2006. Phytotoxicity and innate immune responses induced by Nep1-like proteins. *Plant Cell* 18: 3721–3744.
- Ramírez-Orduña R., Ramírez-Lozano R. G. y López-Gutiérrez F. 2002. Factores estructurales de la pared celular del forraje que afectan su digestibilidad. *Ciencia UANL*, 002:180-189.

- Rauhut T., Luberaeki B. Z., Seitz H. U. and Glawischnig E. 2009. Inducible expression of a Nep1-like protein serves as a model trigger system of camalexin biosynthesis. *Phytochem.* 70: 185–189.
- Ren D., Liu Y., Yang K-Y., Han L., Mao G., Glazebrook J. and Zhang S. 2008. A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 5638–5643.
- Reyes de la Cruz H., Soriano-Bello E., Richards A., Aguilar R. and Sánchez de Jiménez E. 2002. IAA and dOGA induced $[Ca^{2+}]_{cyt}$ elevation in maize (*Zea mays* L.) tissues, however they do not target the same signaling pathway. *TIP.* 5(2): 76-81.
- Ridley B. L., O'Neill M. A. and Mohnen D. 2001. Pectin: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochem.* 57: 929-967.
- Robertsen B. 1986. Elicitors of the production of lignin-like compounds in cucumber hypocotyls. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 28:137-148.
- Romano N. and Macino G. 1992. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol. Microbiol.* 6:3343-3353.
- Rout– Mayer M. A., Mathieu Y., Cazalé A. C., Guern J. and Laurière C. 1997. Extracellular alkalization and oxidative burst induced by fungal pectin lyase in tobacco cells are due to the perception of oligogalacturonidic fragments. *Plant Physiol. Biochem.* 35: 321-330.
- Rudd J., Keon J. and Hammond-Kosack K. E. 2008. The Wheat Mitogen-Activated Protein Kinases TaMAPK3 and TaMAPK6 are differentially regulated at multiple levels during compatible disease interactions with *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Physiol.* 147: 802-815.
- Samaj J., Ovecka M., Hlavacka A., Lecourieux F., Mexkiene I., Lichtscheidl I., Lenart P., Salaj J., Volkmann D., Bögre L., Baluska F. and Hirt H. 2002. Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth. *EMBO J.* 21: 3296-3306.

- Savatin D. V., Ferrari S., Sicilia F. and De Lorenzo G. 2011. Oligogalacturonide-auxin antagonism does not require posttranscriptional gene silencing or stabilization of auxin response repressors in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 157: 1163-1174.
- Schuhegger R., Nafisi M., Mansourova M., Petersen B. L., Olsen C. E., Svatos A., Halkier B. A. and Glawischnig E. 2006. CYP71B15 (PAD3) catalyzes the final step in camalexin biosynthesis. *Plant Physiol.* 141: 1248–1254.
- Silipo A., Erbs G., Shinya T., Dow J. M., Parrilli M., Lanzetta R., Shibuya N., Newman M. A. and Molinaro A. 2010. Glyco-conjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity. *Glycobiol.* 20:406-419.
- Simpson S.D., Ashford D. A., Harvey D. J. and Bowles D.J. 1998. Short chain oligogalacturonidos induce ethylene production and expression of the gene encoding aminocyclopropane 1-carboxylic acid oxidase in tomato plants. *Glycobiol.* 8:579-583.
- Smith L. G. 2001. Plant cell división: building walls in the right places. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 33-39.
- Stennis M. J., Chandra S., Ryan C. A. and Low, P. S. 1998. Systemin potentiates the oxidative burst in cultured tomato cells. *Plant Physiol.* 117: 1031-1036.
- Stone J. M., Heard J. E., Asai T. and Ausubel F. M. 2000. Simulation of fungal-mediated cell death by fumonisin B1 and selection of fumonisin B1-resistant (fbr) Arabidopsis mutants. *Plant Cell* 12: 1811–1822.
- Suarez-Rodriguez M. C., Adams-Phillips L., Liu Y., Wang H., Su S. H., Jester P. J., Zhang S., Bent A. F. and Krysan P.J. 2007. MEKK1 is required for flg22-induced MPK4 activation in Arabidopsis plants. *Plant Physiol.* 143:661-669.
- Suarez L. y Hernández M. 2008. Efecto de una mezcla de oligogalacturonidos en la propagación in vitro de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Cultivos tropicales* 29: 47-52
- Tagu D. y Moussard C. 2003. Fundamentos de las técnicas de biología molecular. Editorial ACRIBIA, S.A. 2, 178 pp.
- Takahashi F., Yoshida R., Ichimura K., Mizoguchi T., Seo S., Yonezawa M., Maruyama Y., Yamaguchi-Shinosaki K. and Shinozaki K. 2007. The mitogen-

activated Protein kinase cascade MKK3-MKK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* 19: 805-818.

Teige M., Scheikl E., Eulgem T., Doczi R., Ichimura K., Shinozaki K., Dangl J. and Hirt H. 2004. The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in Arabidopsis. *Mol. Cell* 15: 141–152.

Tepper C.S. and Anderson A.J. 1990. Interactions between pectic fragments and extracellular components from the fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 36:147-158.

Thomma B. P. H. J., Nelissen I., Eggermont K. and Broekaert F. 1999. Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of Arabidopsis thaliana to the fungus *Alternaria brassicicola*. *Plant J.* 19: 163-171.

Tsuji J., Jackson E.P., Gage D.A., Hammerschmidt R. and Somerville S. C. 1992. Phytoalexin accumulation in Arabidopsis thaliana during the hypersensitive reaction to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Physiol.* 98: 1304–1309.

Valderrama F. A. M., Arango I. R. y Afanador K. L. 2005. Transformación de plantas mediada por Agrobacterium: “Ingeniería genética natural aplicada”. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín.* 58: 2569-2585.

Van-Halbeek H. 1994. NMR developments in structural studies of carbohydrates and their complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4: 697–709.

Van Loon L.C. and Van Kammen A. 1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN' II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology.* 40: 199-211.

Van Norman J. M. and Benfey P. N. 2009. *Arabidopsis thaliana* as a model organism in systems biology. *Rev. Syst. Biol. Med.* 3: 372-379.

Van Pelt-Verkuil E., Van Belkum A. and Hays P. 2008. Principles and technical aspects of PCR amplification. Springer. XII: 332 pp.

- Vleeshouwers V.G., van Dooijeweert W., Govers F., Kamoun S. and Colon L.T. 2000. The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta* 210: 853-64.
- Walker-Simmons M., Jin D., West C.A., Hadwiger L. and Ryan C.A. 1984. Comparison of proteinase inhibitor-inducing activities and phytoalexin elicitor activities of a pure fungal endopolygalacturonase, pectic fragments, and chitosan. *Plant Physiol.* 76:833-836.
- Wang H., Ngwenyama N., Liu Y., Walker J. C. and Zhang S. 2007. Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 63–73.
- Wang P., Du Yanyan., Li Y., Ren D. and Song C. P. 2010. Hydrogen peroxide-mediated activation of MAP Kinase 6 modulates nitric oxide biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22: 1-18.
- Willats W. G. T., McCartney L., Mackie W. and Knox J. P. 2001. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol. Biol.* 47: 9–27.
- Wilson Z. A. 2000. *Arabidopsis*. Editorial Oxford University Press., USA. pp. 1-4.
- Xu J., Li Y., Wang Y., Liu H., Lei L., Yang H., Liu G. and Ren D. 2008. Activation of mapk kinase 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis and enhances sensitivity to salt stress in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 283: 26996-27006.
- Yoo S. D., Cho Y. H., Tena G., Xiong Y. and Sheen J. 2008. Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C₂H₄ signalling. *Nature* 451: 789–795.
- Zhang S. and Liu Y. 2001. Activation of salicylic acid-induced protein kinase, a mitogen-activated protein kinase, induces multiple defense responses in tobacco. *Plant Cell* 13: 1877–1889.
- Zhang T., Liu Y., Yang T., Zhang L., Xu S., Xue L. and An L. 2006. Diverse signals converge at MAPK cascades in plant. *Plant Physiol. Biochem.* 44:274-283.
- Zhou N., Tootle T. L. and Glazebrook J. 1999. *Arabidopsis* PAD3, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome p450 monooxygenase. *Plant Cell* 11: 2419-2428.