



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS

Programa de Doctorado Institucional en Ciencias Biológicas
Opción Biología Experimental

**ANÁLISIS FENOTÍPICO Y MOLECULAR DEL
ESTIMULADOR DE DEFENSAS OGA EN LA RAÍZ
DE *Arabidopsis thaliana***

TESIS

QUE PRESENTA:

M. en C. GEORGINA HÉRNANDEZ MATA

PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
OPCIÓN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

ASESOR
D.C. GUADALUPE ZAVALA
COASESOR
D.C. ELDA MARÍA BELTRÁN PEÑA

MORELIA, MICHOACÁN MAYO 2010

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
I. RESUMEN GENERAL.....	1
II. SUMMARY.....	4
III. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	7
3.1. El estrés en las plantas.....	8
3.1.1. Respuestas de la planta al estrés por factores bióticos.....	9
3.1.2. Estimuladores de pared celular vegetal: los oligogalacturónidos.....	12
3.1.3. Los oligogalacturónidos y su efecto en el desarrollo vegetal.....	14
3.2. Las auxinas y el desarrollo vegetal.....	15
3.2.1. El transporte polar de auxinas.....	18
3.2.2. Las fosfoglicoproteínas PGP.....	21
3.2.3. La arquitectura del sistema radicular.....	19
3.2.4. Los flavonoides: moduladores del PAT.....	23
IV. HIPÓTESIS.....	27
V. OBJETIVOS.....	28
VI. RESULTADOS.....	29
CAPÍTULO 1	
Oligogalacturonide-induced immunity alters root growth in a process involving flavonoid accumulation in <i>Arabidopsis thaliana</i>	38
CAPÍTULO 2	
El crecimiento de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> es afectado por un oligogalacturónido estimulador de defensas.....	55
CAPÍTULO 3	
La activación de la defensa por OGA ₁₀ afecta la respuesta a auxinas y la arquitectura de la raíz al activar la síntesis de flavonoides en <i>Arabidopsis thaliana</i>	69
VII. DISCUSIÓN GENERAL.....	87
VIII. PERSPECTIVAS Y/O RECOMENDACIONES.....	95
X. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA.....	99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Factores bióticos y abióticos que inducen estrés en la planta.....	
Figura 2. Interacción planta-patógeno.....	
Figura 3. Producción de estimuladores de defensa durante la interacción planta-patógeno.....	
Figura 4. Los OGAs y la pared celular vegetal.....	
Figura 5. Procesos de desarrollo vegetal regulados por la auxina.....	
Figura 6. Regulación transcripcional por auxinas.....	
Figura 7. Arquitectura del sistema radicular.....	
Figura 8. Modelo del transporte polar de auxinas.....	
Figura 9. Modelo de las rutas de tráfico celular utilizadas por las proteínas transportadoras de auxinas.....	
Figura 10. Localización de las proteínas ABCB1 (PGP1), ABCB4 (PGP4), y ABCB19 (PGP19) en meristemos radiculares de Arabidopsis.....	
Figura 11. Modelo hipotético de acción de OGA ₁₀	

I. RESUMEN GENERAL

La adaptación y supervivencia de las plantas en un entorno establecido se crea principalmente por la capacidad de adquirir los recursos. En la naturaleza, el crecimiento y desarrollo vegetal están influidos por factores bióticos, debido a que sus raíces y hojas están en contacto con microorganismos saprófitos y patógenos. El suelo es un ambiente con altas poblaciones microbianas, compuesto por microorganismos patógenos y benéficos; por tal razón, las raíces de las plantas están constantemente expuestas a una gran variedad de microorganismos, y en consecuencia, al interactuar con ellos deben defenderse.

Las respuestas relacionadas con el estrés por patógenos son inducidas por moléculas conocidas como estimuladores. Una serie de reportes han demostrado que los oligogalacturónidos (OGAs), una clase de compuestos derivados de la hidrólisis de la pared celular vegetal durante las interacciones planta-microorganismo, además de actuar como estimuladores, también funcionan como señales para el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Sin embargo, los procesos fisiológicos y celulares que son responsables de dichas respuestas aún no han sido dilucidados.

En este trabajo, se utilizó a *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio para investigar el o los mecanismo(s) molecular(es) que regulan los cambios en la arquitectura del sistema radicular (ASR) en respuesta a los estimuladores de defensas OGAs. Cuando las plantas de esta especie crecieron en medio nutritivo con concentraciones de 0.1 to 100 ng/ml de OGAs, el desarrollo de las raíces laterales se vio favorecido, en tanto que se observó una inhibición en el crecimiento de la raíz primaria. Para determinar la causa de la disminución en la elongación de la raíz principal y el incremento en el desarrollo de raíces laterales y su posible implicación fisiológica en el mecanismo de defensa de la planta, utilizamos diversas técnicas como son: la cuantificación de metabolitos secundarios, el clareo de tejidos, microscopía óptica y de fluorescencia, el análisis de la expresión de marcadores de división celular *CycB1::uidA* (Colón-Carmona *et al.*, 1999) y de respuesta a auxinas *DR5::uidA* (Ulmasov *et al.*, 1997), así como también, el análisis de la expresión de genes. De esta manera, se encontró que las plantas crecidas en medio MS suplementado con 10 ng/ml de OGAs sintetizaron compuestos antimicrobianos como una respuesta de defensa. Al mismo tiempo el meristemo de la raíz primaria presentó una disminución en la concentración de auxinas, sin mostrar alteraciones en la división celular. Las evidencias mencionadas indican que la activación de la defensa por los OGAs induce al sistema

radicular a entrar en un programa de crecimiento determinado que perturba la acción de las auxinas. La formación de nuevos primordios de raíces laterales y su crecimiento parece estar relacionado con cambios en la concentración y distribución de auxinas en el tejido, particularmente en el periciclo de la raíz. Las bases moleculares de la interacción entre los OGAs y auxinas se abordaron en este trabajo al analizar la respuesta fisiológica de líneas mutantes de *A. thaliana* de respuesta a auxina y de la caracterización de los flavonoides, quienes se ha reportado que funcionan como reguladores naturales del transporte de auxinas. Dichos análisis mostraron que los OGAs alteran la arquitectura del sistema radicular a través de la regulación del transporte de auxinas aparentemente por un mecanismo que involucra la síntesis y acumulación de flavonoides en los sitios de transporte de auxinas en la raíz.

La información presentada en el presente trabajo permite visualizar que la raíz es un órgano capaz de integrar señales de defensa que regulan el desarrollo de la planta bajo un mismo estímulo. El profundizar de manera continua en este sistema de estudio permitirá avanzar en el entendimiento de los procesos que controlan el desarrollo post-embrionario de la raíz y su relación con la respuesta al estrés por patógenos.

II. SUMMARY

The capacity of plants to survive adverse conditions and reach reproductive maturity critically depends on their ability to continuously adapt to changes in the environment. Therefore, plants have evolved an array of intricate regulatory mechanisms that involve the generation of signaling molecules mediating the activation of adaptive responses. In particular, the activation of pathogen specific defense mechanisms upon microbial infection, as well as the acquisition of architectural and physiological adjustments to environmental changes, permits survival, development, and reproduction of plants.

The plant cell wall is a complex extracellular structure that plays important roles in plant growth and development (Humphrey and others 2007). It is also the first line of defense against pathogens (Ridley and others 2001). At the early stages of infection, phytopathogenic microorganisms produce enzymes capable of degrading the plant cell wall (Vorwerk and others 2004); among these enzymes, polygalacturonases (PGs) cleave the α -1, 4 glycosidic bonds present between the galacturonic acid units of homogalacturonan, the main component of pectin. PGs not only enable pathogens to enter, but also activate defense responses in the plant. These plant defense responses are triggered by fragments of homogalacturonans with a wide degree of polymerization of 3 to 15 residues called oligogalacturonides (α -1,4-D-oligo-GalUA) or OGs, which accumulate in the plant apoplast (Spiro and others 1998; Denoux and others 2008; Cabrera and others 2008). OGs actions include the production of reactive oxygen species, glucanases, chitinases, phytoalexins, and expression of inducible genes involved in the production of antimicrobial compounds (Ridley and others 2001; Nafisi and others 2007; Denoux and others 2008). In *Arabidopsis thaliana*, OGs induce the expression of several defense genes, including *PAD3*, which encodes the cytochrome P450 (CYP71B15) enzyme that catalyzes the last step in camalexin biosynthesis (Ferrari and others 2007). In addition to these defense events, OGs have also been shown to induce changes in plant growth and development (Mauro and others 2002; Spiro and others 2002). Treatment of bean plants with a decagalacturonide (OG₁₀) has shown a marked reduction in primary root growth and alterations in lateral root formation (Hernandez and others 2006). Increasing experimental evidence indicates that exogenously added OGs are able to antagonize the action of the phytohormone auxin (indole-3-acetic acid, IAA) (Ridley and others 2001; Hernández and others 2006). Since auxin plays an essential role in growth and developmental processes in plants, the changes effected by OGs in the root system architecture appear to be mediated at least in part by auxin signaling. Auxin controls many different aspects of plant development, recent reports has shown that these distinct auxin response contexts are

defined by complex and inter-dependent relationships between auxin metabolism, transport and response (Kieffer and others 2010). Specifically, directional (polar) transport of the auxin between cells is a plant-specific form of developmental regulation. Transport-based asymmetric auxin distribution within tissues produces auxin gradients, which play important roles in many developmental processes, including cell patterning and tropisms (Tanaka and others 2006). IAA moves throughout the plant by phloem or by a more controlled polar transport system (PAT). PAT is a process regulated by AUXIN RESISTANT 1/LIKE AUX1 (AUX1/LAX) uptake proteins, PIN-FORMED (PIN) efflux carriers, and P-GLYCOPROTEIN (MDR/PGP/ABCB) efflux/conditional transporters (Swarup and others 2001; Swarup and others 2004; Kleine-Vehn and others 2006; Wu and others 2007; Mravec and others 2008; Kieffer and others 2010). There are several *Arabidopsis* mutants defective on the production of auxin transport proteins or in the correct location of these proteins that show auxin-related phenotypes, including *aux1-7* and *doc1/tir3*. The *aux1-7* mutant is defective at the *AUX1* locus (Swarup and others 2001), while *doc1/tir3* is a mutant allele of *BIG*, which encodes a protein important for the correct location of the PIN1 auxin transport protein (Gil and others 2001).

In this study with the aim of testing a potential OGs-auxin interaction and its role in flavonoid biosynthesis and plant development, we evaluated the effects of oligogalacturonides (OGs), members of a class of defense stimulators, in *Arabidopsis* root system architecture. For reach that aim, gene expression and camalexin quantification in *Arabidopsis* wild-type plants treated with OGs were analyzed to determine *PAD3* accumulation and camalexin biosynthesis, two well known markers of defense responses. Besides, histochemical, molecular and fluorescence analyses in WT and mutant plants were used to determine if flavonoid accumulation is involved in auxin transport modulation in the primary root.

III. INTRODUCCIÓN GENERAL

3.1. El estrés en las plantas.

Al igual que los animales, las plantas han evolucionado para sobrevivir en casi todos los nichos climáticos y ambientales disponibles. Se considera como estrés, al cambio de cualquier factor ambiental que actúe sobre la planta afectando las respuestas bioquímicas y fisiológicas de las mismas, y que puede provocar daños o lesiones y la disminución del crecimiento (Taiz y Zeiger 2006). Debido a esto, las plantas han desarrollado mecanismos únicos para hacer frente a dichas condiciones, tanto en términos de crecimiento y desarrollo, como en defensa. El propósito de tales mecanismos consiste en maximizar el ahorro de energía, disminuir la pérdida de agua y utilizar las reservas para mantener las funciones vitales. Lo anterior es necesario debido a la naturaleza sésil de las plantas, ya que no les permite desplazarse a entornos más favorables, por ello, la exposición y percepción de dichos estreses son determinantes fundamentales del crecimiento y desarrollo de la planta (**Fig. 1**) (Taiz y Zeiger 2006).

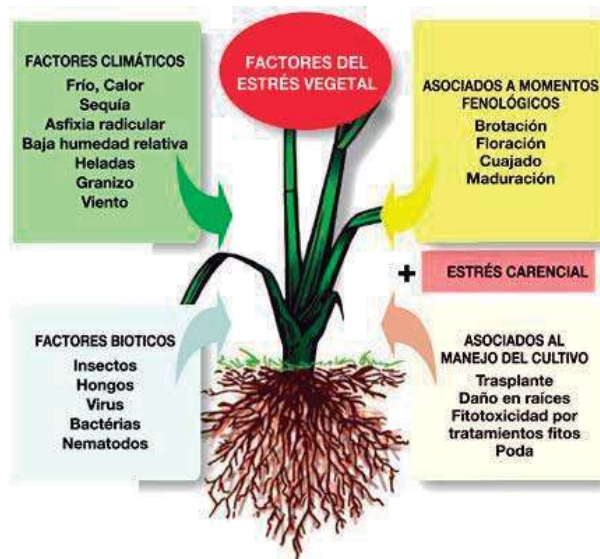


Figura 1. Factores bióticos y abióticos que inducen estrés en la planta. Durante todo su ciclo de vida, las plantas se ven expuestas a una variedad de factores de estrés que afectan las respuestas bioquímicas y fisiológicas de las mismas, y en algunos casos pueden provocar daños o lesiones (Tomada de: www.bioiberica.com/images/planta_estres_veg.jpg).

3.1.1. Respuestas de la planta al estrés por factores bióticos.

Además de los daños inducidos por los factores abióticos, un gran número de pérdidas de cosechas se deben a enfermedades causadas por diversos factores que incluyen una amplia gama de organismos tales como bacterias, hongos, virus, protozoos y nematodos (Agrios 2005). Sin embargo, las plantas son organismos dinámicos que luchan en contra de la presión de los patógenos con estrategias de defensa, por ello, la enfermedad es una excepción más que una norma y las infecciones se producen sólo en un número limitado de casos (Glazebrook 2005).

Una de las primeras respuestas de la planta frente al ataque por patógenos es la resistencia basal, también conocida como resistencia general o inmunidad innata (Chisholm *et al.*, 2006). Dicha inmunidad vegetal se basa en mecanismos innatos que comprenden dos formas principales conocidas como la resistencia basal a las enfermedades ó resistencia horizontal, y la resistencia genética a las enfermedades (*R*) ó resistencia vertical (Abramovitch *et al.*, 2006; Chisholm *et al.*, 2006; Jones y Dangl 2006); Actualmente, estas dos formas de inmunidad se definen como la inmunidad activada por patrones moleculares asociados a patógenos ó PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) mejor conocida como PTI (PAMP-triggered immunity), y la inmunidad activada por efectores ó ETI (Effector-triggered immunity), respectivamente (Chisholm *et al.*, 2006; Jones y Dangl 2006), (**Fig. 2**).

La inmunidad PTI se basa en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a microorganismos ó MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns) y de patrones moleculares asociados al daño ó DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns), anteriormente conocidos como “elicitors” ó “estimuladores” (Montesano *et al.*, 2003, Nürnberger *et al.*, 2004), que actúan como inductores de defensa generales desencadenando respuestas de defensa basal independientemente del genotipo del patógeno y cuyo reconocimiento es mediado por receptores de reconocimiento de patrones ó PRRs (Pattern Recognition Receptors), (Darvill y Albersheim 1984; Boller 1995).

La inmunidad ETI se basa en la interacción específica ya sea directa o indirecta de los efectores de los patógenos y los productos de los genes *R* de la planta, de acuerdo la teoría gen por gen (Flor 1971; Bent y Mackey 2007). Este evento de reconocimiento general conduce a una reacción de defensa llamada la respuesta hipersensible (HR), caracterizada por una rápida apoptosis celular ó muerte celular y una necrosis local (78, 90). La HR también desencadena la activación de las defensas locales y sistémicas, incluyendo el

entrecruzamiento de las proteínas de la pared celular (las paredes de las células que rodean el sitio de la lesión están reforzados con callosa y ligninas), la síntesis de moléculas de señalización tales como el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA), el etileno (ET), la producción de compuestos secundarios como las fitoalexinas, la síntesis de proteínas relacionadas a la patogénesis (PR), y la activación de las cascadas de señalización MAPK (Shah 2009). En la mayoría de los casos, los genes (*R*) codifican para proteínas de resistencia de la clase NB-LRR, proteínas citoplasmáticas con un sitio de unión nuclear (NB) y con repeticiones ricas en leucina (LRR), (Casasoli *et al.*, 2008; Shah 2009).

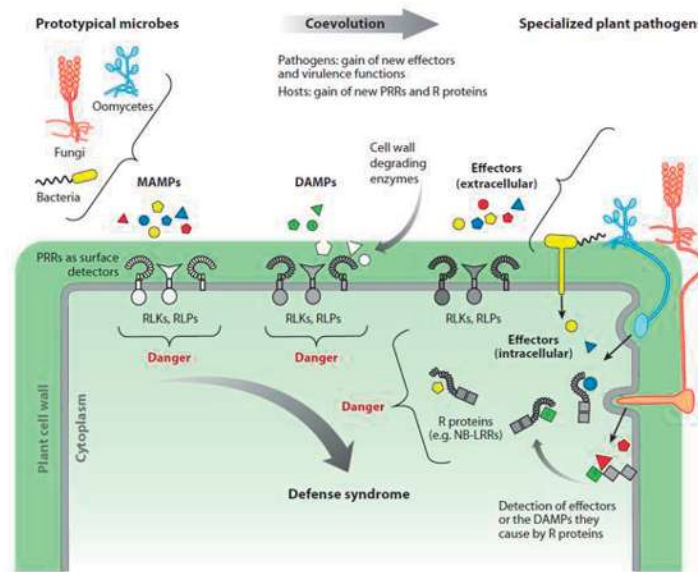


Figura 2. Percepción de las señales de peligro MAMPs, DAMPs y efectores por receptores RRP que activan la defensa vegetal. Los MAMPs extracelulares de provenientes de microorganismos prototípicos y los DAMPS liberados por sus enzimas líticas son percibidos por receptores de reconocimiento de patrones (RRPs). En el curso de la coevolución, los patógenos adquirieron efectores como factores de virulencia, y las plantas evolucionan para sintetizar nuevos RRP y proteínas de resistencia (*R*) para percibir dichos efectores. Cuando los MAMPs, DAMPS y los efectores son reconocidos por los PRRs y las proteínas *R*, se induce un síndrome o respuesta de defensa. RLK, receptor quinasa; RLP, proteína receptor; NB-LRR, sitio de repetición rica en leucina de unión a nucleótidos (Modificado de: Boller y Felix 2009).

La evidencia actual indica que la percepción de las señales de peligro o de ataque por la planta, puede ocurrir en tres formas principales: a través del reconocimiento de los

MAMPs, los DAMPs o de los efectores (**Fig. 2**). En su fase inicial, estas señales de peligro, originadas por virus, bacterias, hongos u oomicetos, estimulan una respuesta de defensa común. Aunque parece ser similar en términos cualitativos, dicha respuesta puede ser diferente en cinética y en términos cuantitativos de acuerdo con las señales de peligro involucradas (Boller y Felix 2009). La percepción de las señales de peligro se produce en el entorno inmediato de la herida y en los sitios de invasión por patógenos. Además de dichas respuestas de defensa local, el ataque microbiano puede desencadenar respuestas a nivel sistémico. En los últimos años, dos formas de resistencia sistémica, denominada respuesta sistémica adquirida (SAR) y la respuesta sistémica inducida (ISR), han recibido mucha la atención (Pieterse y Dicke 2007). Dichas respuestas sistémicas son consecuencia de la percepción local de los MAMPs y de otras señales de peligro en el lugar de la invasión (Shah 2009).

Recientemente, se ha propuesto que la inducción de la inmunidad PTI está asociada con la señalización MAPK, la inducción transcripcional de proteínas de respuesta a patógenos y la expresión de genes de defensa para la síntesis de productos secundarios, la deposición de refuerzos poliméricos de la pared (p.ej., callosa, lignina, y otros polímeros fenólicos) en los sitios de infección, la supresión del crecimiento del patógeno y la síntesis de fitoalexinas (Mur *et al.*, 2008; Pitzschke *et al.*, 2009; García y Parker 2009).

En respuesta a un ataque por patógenos, muchas plantas activan de manera rápida la síntesis de compuestos “antibióticos” de bajo peso molecular. Dichos compuestos son mejor conocidos como fitoalexinas. En *A. thaliana* la fitoalexina camalexina (3-tiazol-20-il-indol) forma parte integral de la red de reacciones de defensa en esta planta (Glawischnig 2007). De igual manera, los estimuladores PAMPs también pueden inducir la acumulación de camalexina (Qutob *et al.*, 2006; Gust *et al.*, 2007; Rauhut *et al.*, 2009). La síntesis de esta fitoalexina a partir del triptófano (Trp), requiere de la activación transcripcional de los genes que codifican para las enzimas de biosíntesis, dicha activación ocurre por la acción de las proteínas cinasas activadas por mitógeno: MPK3, MPK6 (Ren *et al.*, 2008) y MPK4 (Qiu *et al.*, 2008). La MPK4 interacciona físicamente con el núcleo, con su sustrato MKS1 y con WRKY33, un activador transcripcional de la biosíntesis de camalexina.

Posterior al ataque por patógenos o después del tratamiento de las plantas con PAMPs, MPK4 se activa y fosforila a MKS1, lo que resulta en la liberación del complejo MKS1/WRKY33, permitiendo así que WRKY33 active la expresión de genes biosintéticos

de camalexina (Qiu *et al.*, 2008). Por otra parte, algunos factores de estrés abiótico como el tratamiento con iones de metales pesados o con radiación UV-B, también pueden activar la síntesis de camalexina, así como también la producción de especies reactivas de oxígeno (Van Breusegem *et al.*, 2008).

3.1.2. Estimuladores de pared celular vegetal: los oligogalacturónidos.

Desde las primeras observaciones de las células vegetales hechas por Robert Hooke en 1665 hasta los años 80's, la pared celular vegetal había sido considerada como una estructura rígida y estática, cuya función principal era la de conferir un soporte mecánico a la célula. Sin embargo, a lo largo de los últimos 30 años se ha hecho más evidente que la pared celular es una estructura altamente dinámica e integralmente involucrada en el ciclo vital de una planta: es básica en procesos celulares como la división, el crecimiento y la diferenciación, determinando así la forma, el tamaño y la velocidad de crecimiento de cada célula (Carpita y McCann 2000; Somerville *et al.*, 2004; Humphrey *et al.*, 2007), (**Fig. 3A**).

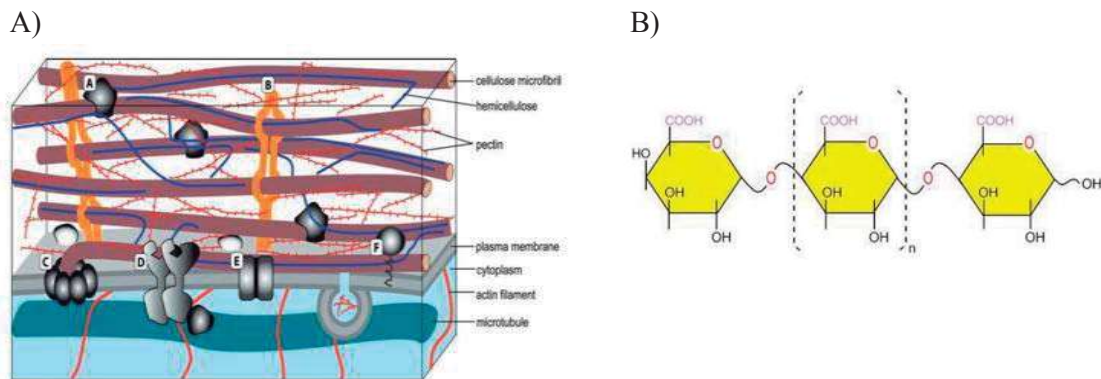


Figura 3. Los OGAs y la pared celular vegetal. A) Pared Celular Vegetal que muestra cada uno de sus componentes: la pectina, lamela media y la pared primaria, integrada por proteínas y microfibrillas de celulosa (Humphrey *et al.*, 2007). B) Estructura química de los OGAs (Ridley *et al.*, 2001).

Durante la interacción entre la planta y el patógeno, la pared celular en ambos organismos es el blanco de acción principal. En el caso de los patógenos, estos secretan numerosas

enzimas glicosil hidrolasas y liasas (como son: β -1,4-y β -1,3-glucanasas, pectinasas, xylosidasas, arabinosidasas glucosidasas) que tienen como objetivo la degradación de la pared celular para colonizar la planta, sin embargo, esta acción también conduce a la liberación de fragmentos de pared conocidos como estimuladores endógenos o damage-associated molecular patterns (DAMPs) (Côte y Hahn 1994; Hüchelhoven 2007; Boller y Felix 2009). Dichos fragmentos poseen diversas actividades biológicas por lo que se definen como moléculas de señalización (Ridley *et al.*, 2001) que pueden funcionar como activadores de diversas respuestas de defensa en la planta (Ridley *et al.*, 2001; Aziz *et al.*, 2007). Tal es el caso de la degradación de la celulosa por enzimas β -1,4-glucanasas, que conduce a la hidrólisis del dominio homogalacturónico de la pectina de la pared celular, generando así fragmentos de ácidos oligogalacturónicos (OGAs, **Fig. 4**).

Los OGAs son los elicitores mejor caracterizados, su capacidad para provocar una respuesta biológica depende de la longitud de su molécula (Grado de polimerización (dp) $>$ 9, **Fig. 3B**) así como del grado de metil-esterificación (Osorio *et al.*, 2008). El tratamiento de las plantas con OGAs puede provocar la entrada de calcio a la célula, la producción de las ROS, cambios en los niveles de expresión génica y en las rutas del ET y el JA (Aziz *et al.*, 2004; Moscatiello *et al.*, 2006) (**Fig. 4**).

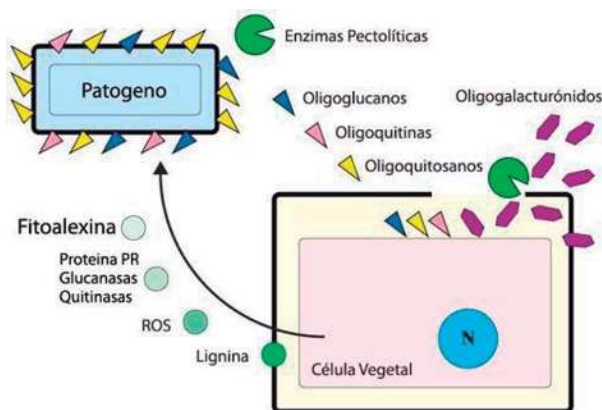


Figura 4. Producción de estimuladores de defensa durante la interacción planta-patógeno. La interacción inicia por el ataque del patógeno a la pared celular vegetal por enzimas pectolíticas (azul, rosa y amarillo), dicha acción libera estimuladores endógenos (morado), como los OGAs. Los estimuladores son reconocidos por un receptor putativo de membrana e inician una

variedad de respuestas de defensa en la planta con el propósito de eliminar al patógeno y limitar su extensión. (Modificada de: Ebel y Scheel 1997).

Asimismo, el genoma vegetal codifica para una amplia gama de enzimas modeladoras de la pared celular, cuya actividad es importante en la regulación de la expansión celular de la planta, pero no solo eso, sino también puede generar elicitores oligosacáridos bajo ciertas condiciones de estrés (Hématy *et al.*, 2009).

Un número importante de estudios han revelado la gran variedad de respuestas biológicas a los OGAs, las cuales dependen de la especie vegetal, el bioensayo y la estructura química o grado de polimerización del OGA utilizado; de forma general se han descrito como respuestas de defensa, sin embargo existen evidencias experimentales que muestran respuestas relacionadas con el crecimiento y desarrollo vegetal (Ridley *et al.*, 2001, Hernández *et al.*, 2006).

3.1.3. Los oligogalacturónidos y su efecto en el desarrollo vegetal.

La mayor parte de las respuestas del desarrollo atribuidas a los OGAs indican que estos compuestos requieren tener un grado de polimerización (GP) de 9 a 18 residuos para ejercer su actividad, siendo los más activos los OGAs con GP de 10 a 16 (Ridley *et al.*, 2001).

Con el fin de dilucidar el mecanismo a través del cual los OGAs afectan el desarrollo de la planta, diversos grupos de investigación han aislado fragmentos con grados de GPs variables y han evaluado su efecto sobre el desarrollo de plantas sanas silvestres. Los resultados han mostrado que los OGAs que activan la síntesis de fitoalexinas (GP= 9 a 12) son eficaces para regular la morfogénesis de plántulas de tabaco (Eberhard *et al.*, 1989), inducir floración (Marfá *et al.*, 1991), inhibir el crecimiento de la raíz (Bellicampi *et al.*, 1993), para modificar la arquitectura de la raíz de plántulas de *Phaseolus vulgaris* (Hernández *et al.*, 2006) y la organogénesis de la raíz, entre otros efectos (Ferrari *et al.*, 2008).

Actualmente, el mecanismo de acción de los OGAs permanece confuso. La dilucidación de dicho mecanismo es ardua debido a las posibles interacciones entre los OGAs y los reguladores de crecimiento de la planta y/o con moléculas de señalización (Ridley *et al.*, 2001, Hernández *et al.*, 2006, Ferrari *et al.*, 2007). En particular, los efectos en el

desarrollo vegetal parecen estar asociados con la acción de las auxinas, ya que en cada trabajo que reporta la regulación del crecimiento y desarrollo de tejidos vegetales por los OGAs, a excepción de la maduración de frutos, su efecto es contrario al de las auxinas (Ridley *et al.*, 2001).

Algunos grupos de investigación han reportado que el tratamiento con OGAs biológicamente activos induce la inhibición de la formación de raíces (Bellincampi *et al.*, 1993) e incrementan la formación de estomas (Altamura *et al.*, 1998) en explantes de hoja de tabaco incubadas en medios con concentraciones específicas de auxinas. Dichos efectos sobre la morfogénesis en tabaco pueden ser reproducidos si los explantes son cultivados en medios con concentraciones bajas de auxina (Branca *et al.*, 1988, Eberhard *et al.*, 1989, Altamura *et al.*, 1998). Asimismo, los OGAs inhiben la expresión inducida por auxina del oncogene vegetal *rolB* (Bellincampi *et al.*, 1996), y la división inducida por auxina de las células del parénquima (Altamura *et al.*, 1998) en explantes de disco de hoja de tabaco. Así como también inhiben la elongación inducida por auxina en la raíz primaria de plantas de frijol (Hernández *et al.*, 2006).

3.2. Las auxinas y el desarrollo vegetal.

El término auxinas se refiere a un importante grupo de fitohormonas implicadas en la mayor parte de los cambios de crecimiento que ocurren durante el ciclo de vida de una planta, su nombre se derivó del vocablo griego “*auxein*” que significa *crecer*, pues uno de sus principales papeles es la regulación de la elongación de tallos jóvenes (Taiz y Zeiger 2006; Mockaitis y Estelle 2008; Tromas y Perrot-Rechenmann 2010). Las auxinas fueron las primeras hormonas que se descubrieron, y hasta pasados los años 30’s se descubrió la estructura de la primera auxina: el ácido indolil-3-acético, comúnmente conocido como indolacético o AIA; el primer indicio de su existencia se derivó de los estudios relacionados con los tropismos (Taiz y Zeiger 2006; Tromas y Perrot-Rechenmann 2010). Los experimentos de Darwin (1880), Boysen-Jensen (1913) y Paál (1919) sobre la curvatura de los coleóptilos de plantas gramíneas en respuesta a la luz, llevaron a postular la existencia de sustancias que se “movían” de forma polarizada y “transmitían” la señal lumínica desde el ápice hacia la parte basal del coleóptilo. De hecho, estas fueron las primeras demostraciones experimentales de una molécula de señalización vegetal y su movimiento intercelular (Taiz y Zeiger 2006). Si bien parece ser que el AIA es la auxina

más importante fisiológicamente hablando, existen otras formas naturales útiles, como el ácido indol-3-butírico (IBA) y el ácido 4-chloroindol-3-ácido acético (4-Cl-IAA). También existen algunas auxinas sintéticas como el ácido-1-naphthalenacético (NAA) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

La auxina es sintetizada mayoritariamente en las hojas jóvenes (Ljung *et al.*, 2001; Tromas y Perrot-Rechenmann 2010), y posteriormente es transportada por toda la planta, aunque también se ha demostrado la importancia de la biosíntesis local de AIA en tejidos específicos para el desarrollo de la planta. El análisis detallado del contenido o concentración de auxina aunado al uso de inhibidores del transporte o de mutantes de la biosíntesis de auxina, ha proporcionado evidencia que muestra que la biosíntesis de auxina no se limita a las hojas jóvenes sino que puede ocurrir, al menos bajo determinadas circunstancias, en la mayoría de los tejidos, incluyendo las raíces (Marchant *et al.*, 2002; Ljung *et al.*, 2005). Más recientemente, el análisis del contenido de AIA y de sus metabolitos en células específicas de la raíz, utilizando marcadores celulares específicos GFP aunado a métodos de espectrometría de masas, reveló que casi todos los tipos de células del ápice de la raíz poseen una elevada capacidad biosintética de AIA (Pettersson *et al.*, 2009).

Las vías de biosíntesis de AIA aun no son completamente dilucidadas, sin embargo el uso de isótopos estables ha revelado que la auxina puede derivarse de dos rutas principales. Una de ellas es conocida como la ruta dependiente de triptófano (Trp), que puede utilizar hasta cuatro rutas distintas; la segunda ruta se deriva de un precursor del Trp y se conoce como la vía independiente del Trp (Tromas y Perrot-Rechenmann 2010).

A nivel celular, la auxina actúa como una señal para la división celular, la elongación y la diferenciación celular durante el transcurso del ciclo de vida de la planta (Abel y Theologis 1996, Guilfoyle *et al.*, 1998, Eckardt 2001). El crecimiento inducido por auxina tiene lugar en dos fases: primero ocurre un aumento relativamente rápido de la longitud del brote, seguido de cambios lentos con aumento de la biomasa y la activación de complejos proteicos reguladores del ciclo celular (Francis *et al.*, 1998). El mecanismo celular a través del cual las auxinas promueven el crecimiento de la planta comienza a ser más claro después de más de un siglo de investigación. El proceso más aparente inducido por auxinas es la elongación celular, proceso que se lleva a cabo en dos etapas iniciando con una rápida elongación celular debido al incremento de protones que favorecen la acidificación de la PCV, así como la actividad de las enzimas hidrolíticas como las celulasas, glicoxidasas,

entre otras, que “debilitan” la PCV induciendo un aumento en la presión de turgencia y provocando finalmente la elongación celular. Dicho proceso es conocido como “Teoría Quimiosmótica” o “Teoría del Crecimiento Ácido” de la PCV postulada por Rayle y Cleland en 1992. En el cuál una segunda fase o elongación a largo plazo, sucede por la expresión génica diferencial de genes para la síntesis de las enzimas hidrolíticas antes mencionada, así como de nuevos polímeros de pared que serán ensamblados para dar lugar a la formación de una nueva PCV en los tejidos elongados (Rayle y Cleland 1992) (**Fig.5**).

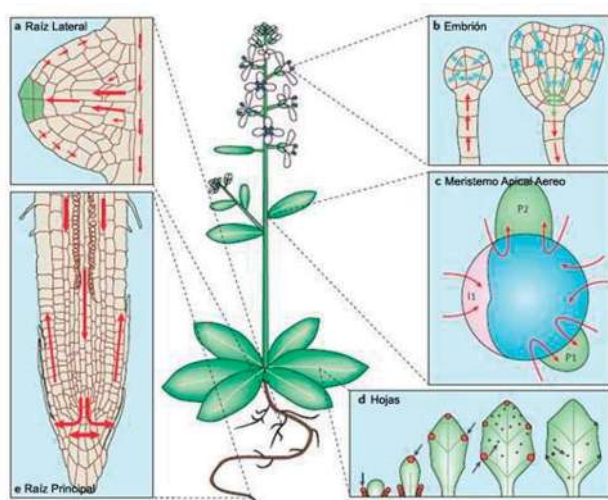


Figura 5. Procesos de desarrollo vegetal regulados por la auxina. a)

Raíz lateral. Las proteínas PIN transportan auxina del centro de la raíz (la estela) hacia la punta o meristemo radicular de la raíz primaria (la auxina se indica en verde y su transporte por flechas rojas), y enseguida se mueve a través de la epidermis. Esto forma las bases del Modelo “Fountain o Fuente” de la formación de raíces laterales (Benkova *et al.*, 2003). **b)** Embrión. La

auxina es distribuida al embrión joven por PIN7. En una etapa posterior, el flujo de auxina cambia por las proteínas PIN1, PIN4 y PIN7 que conducen a la auxina fuera del embrión (Este transporte se indica por flechas azules, verdes y rojas). **c)** Meristemo apical de la parte aérea. La auxina es remitida hacia el sitio de formación de hojas nuevas (Primordios P1 y P2 y el primordio incipiente I1) en la capa epidérmica. El ápice se indica en azul. **d)** Hojas. La auxina media el desarrollo del tejido vascular. Las flechas indican los sitios de producción de auxina y los círculos rojos indican la acumulación de auxina. **e)** Raíz Primaria. Las proteínas PIN determinan el flujo de auxina hacia la punta de la raíz a través de su centro, y de regreso a través de la epidermis. Este flujo forma la base de la capacidad de la raíz de responder rápidamente a la gravedad (Teale y Palme 2006).

A nivel molecular, las auxinas actúan a través de un mecanismo dependiente de la percepción de la hormona por receptores específicos, cuyas funciones son integrales a la ruta ubiquitina (Ub)-proteosoma, encargada de la degradación de proteínas, por lo que su

percepción conduce a la degradación de las proteínas con función de represor transcripcional de genes de respuesta a auxinas, las proteínas *Aux/IAA*, de esta forma puede cambiar rápidamente la expresión génica por la regulación de auxinas (Mockaitis y Estelle 2008). La mayor parte de los genes *Aux/IAA* son regulados transcripcionalmente por las auxinas en una forma dependiente de factores de respuesta a auxina (ARFs) y represores *Aux/IAA* (Abel *et al.*, 1995, Tatematsu *et al.*, 2004, Tian *et al.*, 2002) (**Fig.6**). La regulación de la expresión de estos represores por la auxina sirve como un rápido mecanismo de regeneración en la señalización de auxina. La actividad del receptor de auxina TIR1, completa esta giro regulatorio al desestabilizar a las proteínas *Aux/IAA*. Cundo esta retroalimentación es interrumpida y comienzan a acumularse proteínas represoras *Aux/IAA*, se presentan diversas alteraciones en el desarrollo vegetal.

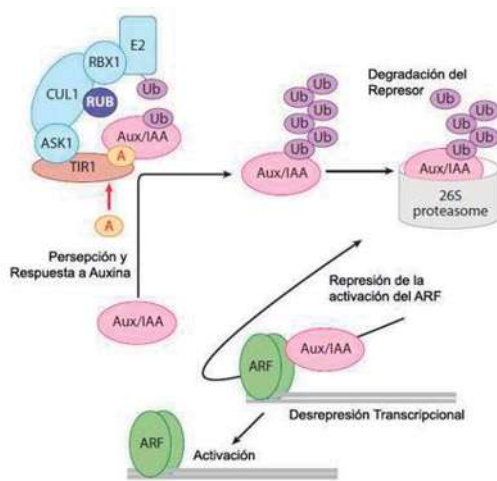


Figura 6. Regulación transcripcional por auxinas. La auxina (A) une a la proteína con Caja F TIR1 al complejo SCF^{TIR1} y estabiliza la interacción entre TIR1 y su sustrato represor *Aux/IAA*. El represor es poliubiquitinado y degradado por el proteosoma 26S. La pérdida del represor *Aux/IAA* permite al factor de respuesta a auxina (ARF) llevar a cabo la transcripción de genes regulados por auxina. E2, enzima de conjugación de Ubiquitinas (Mockaitis y Estelle 2008).

3.2.1. El transporte polar de auxinas.

Aunque casi todos los tejidos de las plantas parecen ser capaces de sintetizar auxinas, la mayoría se produce en las partes jóvenes de la planta tales como los brotes apicales, las hojas jóvenes y las semillas en desarrollo (Ljung *et al.*, 2001). Estudios recientes han mostrado que las auxinas también pueden ser sintetizadas en raíces, principalmente en las zonas meristemáticas como son las puntas de la raíz primaria y de las raíces laterales en desarrollo (Ljung *et al.*, 2005).

De los sitios de síntesis, la auxina se distribuye a través de todo el cuerpo de la planta, y es utilizada para una gran variedad de procesos de desarrollo tales como la división y la elongación celular, la formación de raíces laterales, dominancia apical y las respuestas a estímulos del medio ambiente, entre otros (Davies 2004). La regulación de la distribución de auxina en la planta juega un papel esencial en muchos procesos del desarrollo (Leyser 2006, Scheres y Xu 2006, Teale *et al.*, 2006).

La auxina es distribuida a los tejidos por un sistema de transporte direccional célula-a-célula denominado transporte polar de auxina (PAT), mediado por la localización subcelular de las maquinarias de influjo y eflujo de la hormona. Es decir, que los procesos regulados por las auxinas no dependen únicamente de su biosíntesis y metabolismo, sino también del establecimiento de gradientes de concentración de la hormona dado por el PAT (Benkova *et al.*, 2003, Benjamins *et al.*, 2005).

Los principales actores implicados en el PAT son proteínas trans-membranales que actúan como transportadores de entrada o influjo o bien de salida o eflujo regulando el transporte de auxinas hacia y desde el apoplasto; el modelo quimiosmótico del PAT propuesto por Rubery y Sheldrake en 1974 y por Raven en 1975, expresa que la auxina, un ácido débil, puede entrar libremente en la célula, sin embargo, una vez dentro es atrapada debido al pH alto del citosol (pH~7) en comparación con el del apoplasto (pH~5) (Rubery y Sheldrake 1974; Raven 1975). La entrada de auxinas a la célula ocurre principalmente a través de difusión pasiva, sin embargo, también se transportan de forma activa (**Fig.**). A la fecha, el único acarreador de auxinas descrito es AUXIN RESISTANT 1 (AUX1) PERMEASE1/LIKE AUX (AUX1/LAX), es el único acarreador de influjo de auxinas descrito a la fecha (Bennett *et al.*, 1996, Swarup *et al.*, 2000, Titapiwatanakun y Murphy 2008).

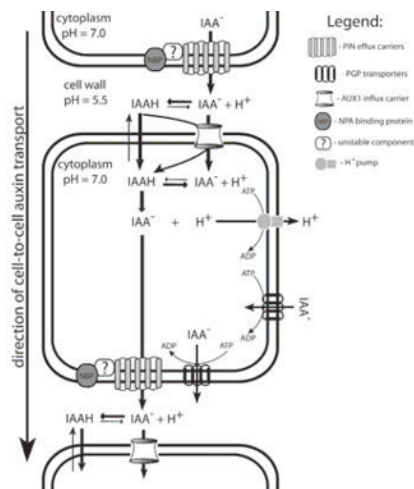


Figura 7. Modelo del transporte polar de auxinas.

De acuerdo a la hipótesis quimiosmótica, la diferencia de pH entre la relativamente ácida pared celular y el citoplasma (mantenido por las H⁺-ATPasas de la membrana celular) promueve la acumulación de IAA (que entró por difusión) dentro de la célula. En el pH más básico del citoplasma, la mayoría del IAAH sufre una desprotonación y permanece "atrapado"

dentro de la célula. El AIA desprotonado sólo puede dejar la célula vía el eflujo activo mediado por los transportadores específicos de eflujo. La distribución asimétrica de dichos transportadores dentro de cada célula, promueve el transporte unidireccional célula a la célula de la auxina (transporte polar). El eflujo de auxina es facilitado por un complejo multicomponente que consiste en los transportadores de eflujo (la familia de proteínas PIN), la proteína de unión al NPA (NBP) y un tercer componente inestable. El transportador de influjo de auxina (AUX1) facilita la respuesta a auxin en la célula. Los transportadores ABC de la familia de glicoproteínas-P (PGP) median el eflujo e influjo adicional (Michniewicz *et al.*, 2007).

La entrada de auxinas mediada por acarreadores es requerido para el transporte en contra de un gradiente de difusión o para impedir la difusión en células vecinas y, por tanto, proporciona un medio eficaz para establecer y mantener concentraciones y distribuciones óptimas de auxinas dentro de las células y tejidos (Swarup *et al.*, 2001, Reinhardt *et al.*, 2003). La familia de proteínas PIN FORMED (PIN) está integrada por 8 miembros, la mayoría de los cuales median el eflujo de auxinas (Paponov *et al.*, 2005; Teale *et al.*, 2006, Friml *et al.*, 2002). Dichas proteínas se expresan en tejidos y células que transportan auxinas, y más importante aún, se localizan asimétricamente en las membranas plasmáticas de estas células, lo que es consistente con la direccionalidad o polaridad del PAT (Friml *et al.*, 2002a; 2002b; 2003).

Las proteínas PIN no son los únicos componentes capaces de mediar el eflujo de auxinas, otra clase de transportadores del eflujo está representada por las proteínas Glicoproteínas-P (PGP) miembros de la familia de proteínas membranales MULTIDRUG RESISTANCE (MDR, resistencia a múltiples drogas), entre las cuales se encuentran las proteínas MDR1, PGP1, PGP2, PGP4, Y PGP19 (Murphy *et al.*, 2000, Brown *et al.*, 2001, Gil *et al.*, 2001, Noh *et al.*, 2001, 2003, Geisler y Murphy 2006).

La distribución de auxina dependiente del PAT y la acumulación espacio-temporal de la hormona en tejidos específicos de la planta mantienen un gran número de procesos del desarrollo como es la formación del eje embrionario, la organogénesis, el mantenimiento de los meristemos, los tropismos y entre otros. La regulación de la actividad de las proteínas transportadoras involucra procesos celulares coordinados, incluyendo interacciones proteína-proteína, tráfico vesicular, fosforilación de proteínas, ubiquitinación y estabilización de los complejos transportadores en la membrana plasmática (Titapiwatanakun y Murphy 2008). Las proteínas reguladoras RCN1 y PID (PINOID), las cuales median la fosforilación y la polaridad de las proteínas PIN, han mostrado tener un

papel importante en la regulación del transporte de auxina, al regular la distribución asimétrica de las proteínas de eflujo e influjo que determinan dicho transporte a través de las células (Galweiler *et al.*, 1998; Christensen *et al.*, 2000; Benjamins *et al.*, 2001; Muday y De Long 2001, Rashotte *et al.*, 2001, Muday y Murphy 2002, Friml *et al.*, 2004) (**Fig. 8**).

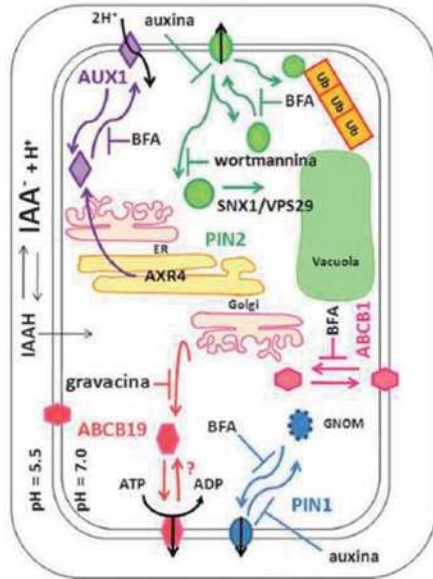


Figura 8. Modelo de las rutas de tráfico celular utilizadas por las proteínas transportadoras de auxinas. El movimiento de auxinas es dependiente de la diferencia de pH entre el apoplasto y el citoplasma celular. La entrada de auxina ocurre vía la difusión de AIAH y el influjo de IAA⁻ a través de la proteína protón-symporter AUX1 (púrpura). El eflujo celular del AIA⁻ es regulado por las proteínas PIN-formed, PIN1 (azul) y PIN2 (verde). El eflujo también es mediado por transportadores dependientes de ATP, las proteínas ABCB (MDR-PGP) (rosa). Aunque

el tráfico celular de PIN1 y PIN2 es sensible a Brefeldina A (BFA), sólo PIN1 sigue la ruta dependiente de GNOM. El tráfico de PIN2 depende del complejo SNX1 y VPS29 que puede ser inhibido por wortmanina. La poza intracelular de PIN2 es marcada para proteólisis a través de la ruta Ub. La proteína AXR4 localizada en el RE, es requerida para la localización de AUX1 en la membrana celular. Las rutas de tráfico de AUX1 y ABCB1 también son sensibles a BFA. El tráfico de ABCB19 no es regulado por los mecanismos dinámicos usados por PIN1 Y PIN2. Gravacina inhibe la localización de ABCB19 a la membrana celular (Titapiwatanakun y Murphy 2008).

3.2.2. Las fosfoglicoproteínas PGPs.

Las glicoproteínas-P de Resistencia a Múltiples Drogas (ABCB/MDR/PGPs, en adelante PGPs), son proteínas membranales que pertenecen al subgrupo ABCB de la superfamilia de transportadores (ABC) que contienen un casete de unión a ATP, y consisten en dos mitades homólogas, con un sitio de hidrólisis de ATP y otro de unión a nucleótidos (Ambudkar *et al.*, 1999).

El miembro mejor conocido del subgrupo ABCB es la proteína humana PGP1 (ABCB1) la cual ha sido ampliamente estudiada por su papel en el incremento de la resistencia a

agentes quimioterapéuticos como resultado de su sobreexpresión en células de cáncer (Luckie *et al.*, 2003). En *Arabidopsis thaliana*, los 21 miembros del subgrupo ABCB muestran distintos patrones de expresión a través de todas las etapas de crecimiento y desarrollo de la planta, sin embargo, en algunos tejidos dicha expresión se traslapa (Blakeslee *et al.*, 2005b). Los miembros mejor caracterizados en *Arabidopsis* son los transportadores de auxina PGP1, PGP4 y PGP19 (**Fig. 9**). Las mutaciones en los genes PGP en *Arabidopsis*, maíz, y sorgo, resultan en reducciones importantes del transporte de auxina, que conducen a una disminución de la elongación y de la dominancia apical, así como alteraciones en las respuestas trópicas (Noh *et al.*, 2001, 2003, Geisler *et al.*, 2003, 2005, Multani *et al.*, 2003, Terasaka *et al.*, 2005, Santelia *et al.*, 2005). Sin embargo, hasta el momento, ninguna pérdida en la polaridad del desarrollo ha sido observada en las mutantes *pgp*, sugiriendo que las PGPs regulan principalmente el transporte de auxina a larga distancia y la carga localizada de la hormona en el sistema de transporte polar y no participa en el establecimiento del flujo basal de auxina vectorial que participa en la organogénesis (Bandyopadhyay *et al.*, 2007, Blakeslee *et al.*, 2007, Bailly *et al.*, 2008).

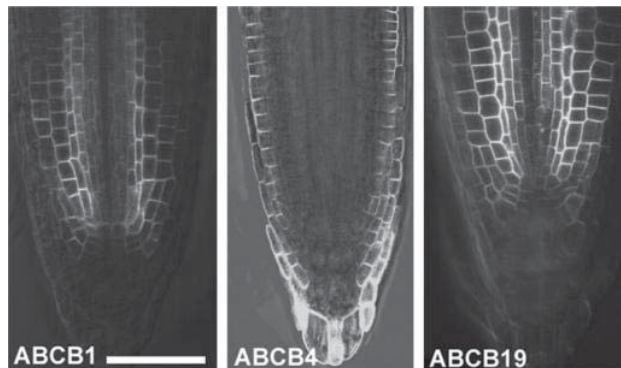


Figura 9. Localización de las proteínas ABCB1 (PGP1), ABCB4 (PGP4), y ABCB19 (PGP19) en meristemos radiculares de *Arabidopsis*. Fotografías que muestran la expresión de la línea transgénica ProABCB1:ABCB1-GFP en tejidos centrales de la raíz (Dr Jiri Friml), ProABCB4:ABCB4-GFP que se expresa en la cofia de la raíz (Dr Misuk Cho) y ProABCB19:ABCB19-GFP que se expresa en el cilindro vascular (Dr Jiri Friml). Barra= 25 μ m. (Tomado de: Titapiwatanakun y Murphy 2008).

Los genes PGP muestran una expresión y localización subcelular de sus productos proteicos específica de tejido. la expresión de la PGP1 está limitada a hojas, ápices y

raíces; las PGP4 se expresan únicamente en la raíz; las MDR1/PGP19, que parecen tener un papel principal en el PAT de la parte aérea hacia las raíces, se expresan en ápices, hojas y raíces, con una expresión incrementada en plantas crecidas en la oscuridad (Noh *et al.*, 2001, 2003, Geisler *et al.*, 2003, 2005, Terasaka *et al.*, 2005, Santelia *et al.*, 2005, Petrasek *et al.*, 2006, Bouchard *et al.*, 2006) (**Fig. 9**).

Un papel directo en el eflujo celular de auxina para las proteínas PGP1 Y PGP19 fue demostrado al observar la acumulación de auxina en protoplastos de mesófilos en las mutantes *pgp1* y *pgp19* (Geisler *et al.*, 2005). Además, la expresión heteróloga de PGP1 y PGP19 en células HeLa y células de levadura mejoraron el eflujo de la hormona que había sido inhibido por el tratamiento con NPA (Geisler *et al.*, 2005, Bouchard *et al.*, 2006). Las proteínas PGP4 funcionan en el movimiento de auxina lejos de la punta de la raíz y parece funcionar principalmente en la exportación regulada de auxina de la zona de elongación celular (Santelia *et al.*, 2005, Terasaka *et al.*, 2005, Cho *et al.*, 2007, Lewis *et al.*, 2007).

Algunas evidencias experimentales indican que PGP4 funciona en el influjo de auxina. La expresión de PGP4 en células de mamíferos, activa un incremento neto en la retención de auxina (Terasaka *et al.*, 2005), y la expresión heteróloga de PGP4 en la mutante de levaduras sensible a AIA, *yap1*, llevó al incremento de la sensibilidad del crecimiento frente a IAA (Santelia *et al.*, 2005). Sin embargo, el tratamiento de células de mamíferos que expresan la PGP4 con NPA activó el eflujo de auxina a un nivel similar al observado en células tratadas con NPA y que expresan a PGP1 ó a PGP19 (Terasaka *et al.*, 2005). Recientemente, se ha reportado que la expresión de PGP4 confiere actividad de eflujo de auxin en pelos radiculares y en células en suspensión de tabaco (Cho *et al.*, 2007). Estos resultados sugieren que la direccionalidad del transporte mediado por PGP4 es regulado por moduladores específicos (Cho *et al.*, 2007).

3.2.3. Los Flavonoides: moduladores del PAT.

Los flavonoides son metabolitos secundarios que cumplen funciones fisiológicas importantes en el desarrollo vegetal (Taylor y Grotewold, 2005), y han sido implicados en el control del transporte polar de auxina (Jacobs and Rubery 1988, Mathesius *et al.*, 1998, Murphy *et al.*, 2000, Brown *et al.*, 2001, Buer and Muday 2004. Peer *et al.*, 2004).

Entre otras funciones, los flavonoides como la quercetina, el kaempferol y otras moléculas agliconas, han mostrado tener un papel inhibitorio en el PAT y por consiguiente inducen la acumulación localizada de auxina en la planta (Murphy *et al.*, 2000, Brown *et al.*, 2001).

Algunos sitios de acción de los flavonoides han sido identificados como proteínas membranales, mejor conocidas como proteínas de unión a NPA, la subunidad regulatoria NBP (NPA-binding protein) (Jacobs y Rubery 1988, Lomax *et al.*, 1995, Murphy *et al.*, 2000, 2002). La mutante *tir3/doc1* afectada tanto en respuestas a la luz como en el PAT, define un gene conocido como *BIG* que muestra una reducción del número de sitios de unión a NPA en fracciones microsomales (Ruegger *et al.*, 1997, Gil *et al.*, 2001).

Recientemente, las proteínas PGP_s han sido identificadas como NBPs de alta afinidad (Noh *et al.*, 2001, Murphy *et al.*, 2002). Trabajos previos han logrado establecer a FKBP42, TWD1, como un regulador positivo del eflujo de auxina mediado por las PGP_s, a través de interacciones proteína a proteína (Geisler *et al.*, 2003, Bouchard *et al.*, 2006, Bailly *et al.*, 2006). Recientemente se ha reportado que el flavonol quercetina interrumpe la interacción TWD1-PGP1 (Bailly *et al.*, 2008). Lo que es muy interesante, ya que la quercetina también es el flavonoide más eficiente en competir con el NPA por sitios de unión a transportadores de auxina (Jacobs y Rubery 1988). Lo anterior refuerza la propuesta que señala que el eflujo del IAA es inhibido por NPA y quercetina (Geisler *et al.*, 2005, Bouchard *et al.*, 2006). Consistente con esto, la proteína AtPGP1 que se localiza en los meristemas de la planta en donde cumple su función transportadora (Sidler *et al.*, 1998, Geisler *et al.*, 2005), colocaliza con los flavonoides en estas regiones, donde se sugiere que dichos metabolitos afectan el PAT (Peer *et al.*, 2004).

Los flavonoides están presentes en la cofia y columnela de plantas de *A. thaliana* (Murphy *et al.*, 2000, Peer *et al.*, 2001, 2004), específicamente el kaempferol, sin embargo, se ha reportado que la quercetina sólo se acumula después de un pulso de auxina o por el tratamiento con NPA (Peer *et al.*, 2004). Se ha reportado que el kaempferol inhibe la actividad de las mono aminoxidasas de mamíferos que son similares a las oxidadas de IAA (Sloley *et al.*, 2000), por lo que las mutantes de *A. thaliana* deficientes en flavonoides exhiben un incremento en el eflujo del AIA marcado radioactivamente y del AIA oxidado en células del meristemo radicular (Murphy *et al.*, 2000, Par *et al.*, 2004), por lo que se sugiere que el kaempferol podría jugar un papel en la disminución de la oxidación de la auxina destinada al transporte basipetal en la epidermis de la raíz. En tanto que, se ha sugerido que la quercetina que se acumula en respuesta al incremento en los niveles de

IAA, podría también participar en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno que se acumulan durante el catabolismo del AIA (Joo *et al.*, 2001, Schopfer *et al.*, 2002, Ljung *et al.*, 2002).

3.2.4. La arquitectura del sistema radicular.

Intro desarrollo-auxinas para poder entrar a raiz

La raíz es un órgano fundamental que participa en el anclaje de las plantas al suelo, la toma de agua y nutrientes, la síntesis de hormonas y metabolitos secundarios y en las interacciones bióticas y abióticas que tienen lugar en la rizósfera (Raven 1999).

A pesar de su importancia, el estudio de los mecanismos que modulan el desarrollo, la configuración tridimensional de la raíz y sus respuestas al ambiente ha avanzado lentamente con respecto a lo que se ha logrado con su contraparte vegetativa y reproductiva (Schiefelbein y Benfey 1991). Esto se debe a que las raíces crecen subterráneamente, y existen pocos y limitados sistemas para su análisis. En años recientes, con el uso de *Arabidopsis thaliana* como sistema de estudio se ha encontrado que el desarrollo de la raíz es altamente plástico y está influenciado fuertemente por factores ambientales. *Arabidopsis thaliana* también ha permitido establecer metodologías para el análisis morfológico, fisiológico y molecular de la raíz (Schiefelbein y Benfey 1991).

El sistema radicular es un lugar ideal para estudiar los factores determinantes de la arquitectura, y el desarrollo de la plasticidad. Dicho sistema es responsable de la adquisición del agua y los nutrientes que la planta requiere de la tierra. Por lo tanto, no es de extrañar que la arquitectura del sistema radical sea altamente influenciada por señales ambientales.

El sistema radicular se origina de una raíz principal desarrollada durante la embriogénesis; esta raíz primaria desarrolla pelos radiculares y raíces secundarias, que a su vez producen raíces terciarias, cuaternarias y demás, las cuales se han denominado como raíces laterales (**Fig. 10**).

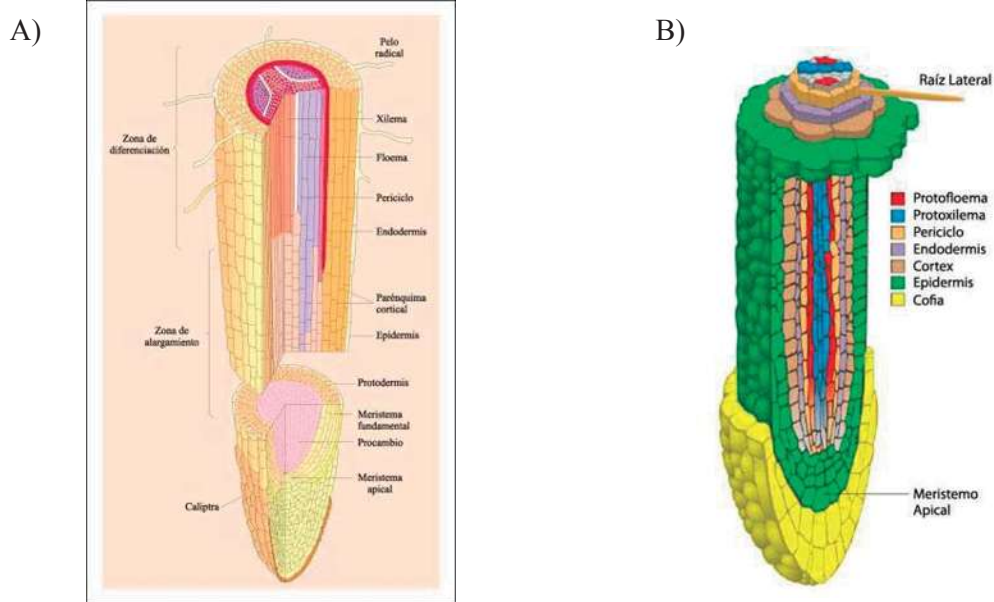


Figura 10. Arquitectura del sistema radicular. A) La raíz se divide en tres importantes zonas de acuerdo al proceso celular que se desarrolla: zona de división, elongación y diferenciación celular. B) Asimismo, de acuerdo a su organización radial, se compone de filas de células diferenciadas que llevan a cabo funciones específicas (iescarin.educa.aragon.es/depart/biogeno).

IV. HIPÓTESIS

OGA₁₀ induce la activación de la defensa y modifica la arquitectura del sistema radicular de *Arabidopsis thaliana* por un mecanismo que involucra la acción de auxina.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el mecanismo molecular que regula los cambios en la arquitectura de la raíz durante la estimulación de la defensa por OGA₁₀ en *Arabidopsis thaliana*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar la respuesta de defensa en *A. thaliana*.
2. Evaluar la respuesta fenotípica del sistema radicular en *A. thaliana*.
3. Evaluar la respuesta de las líneas reporteras de *A. thaliana* *CycB1::uidA* y *DR5::uidA*.
4. Analizar la respuesta fenotípica del sistema radicular de las líneas mutantes de auxina (*aux1-7*, *pgp1*, *pgp4*, *pgp19*, *eir1-1*, *pin1* y *doc1*), y de la línea mutante de flavonoides (*tt4-2*).
5. Determinar la acumulación de flavonoides en *A. thaliana*.

VI. RESULTADOS

CAPITULO 1

PLANT IMMUNITY INDUCED BY OLIGOGALACTURONIDES ALTERS ROOT GROWTH IN A PROCESS INVOLVING FLAVONOID ACCUMULATION IN *Arabidopsis thaliana*.

Georgina Hernández-Mata, María Elena Mellado-Rojas, Alan Richards-Lewis, José López-Bucio, Elda Beltrán-Peña and Eva Luz Soriano-Bello*. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México, Morelia, Michoacán 58030. Tel/Fax (01443) 326 5788 ext. 112.

*Corresponding author, e-mail: esoriano@umich.mx

Abstract

Although it has been speculated that activation of defense responses leads to plant growth adjustment, little is known about plant developmental and architectural responses to defense stimulators. In this report, we evaluated the activity of oligogalacturonides (OGs), molecules directly involved in plant immunity to modulate root system architecture in *Arabidopsis thaliana*. We show that this compound induce *PAD3* expression and camalexin synthesis, two well-known markers of defense responses. These effects were related to primary root growth inhibition and increased lateral root and root hair formation, which are reminiscent of altered auxin responses. Cellular analysis showed that the effect of this compound on primary root growth was due to changes in cell elongation and increased flavonoid accumulation at the root elongation region. Moreover, the observation that similar changes in primary root growth were induced by naphthylphtalamic acid supply and that auxin transport mutants *doc1*, *pgp1*, *pgp4*, *pgp19*, signaling mutant *tir1-1* and flavonoid mutant *tt4-1* show differential responses to primary root growth inhibition by OGs suggests that auxin distribution and signaling plays a role in the oligogalacturonide-induced alteration of root cell patterning. Our results suggest that OGs might play a dual function in adaptation of plants to pathogen challenge by inducing defense responses and plant architecture adjustment.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*; Oligogalacturonides; Root architecture; Flavonoids; Auxin Transport, Auxin Signaling, Defense, Camalexin.

Introduction

The capacity of plants to survive adverse conditions and reach reproductive maturity critically depends on their ability to continuously adapt to changes in the environment. Therefore, plants have evolved an array of intricate regulatory mechanisms that involve the generation of signaling molecules mediating the activation of adaptive responses. In particular, the activation of pathogen specific defense mechanisms upon microbial

infection, as well as the acquisition of architectural and physiological adjustments to environmental changes, permits survival, development, and reproduction of plants.

Physiological and ecological constraints play key roles in plant growth and developmental patterns, especially in relation to defense against pathogens or in the interactions with beneficial microorganisms. Plant activity at the cellular level can be classified as growth (cell division and enlargement) and differentiation (chemical and morphological changes leading to cell maturation and specialization). These processes are often affected in response to microorganisms because plants must grow fast enough to compete, yet maintain the defenses necessary to survive in the presence of pathogens or symbiotic organisms (Herms and Mattson 1992).

The plant cell wall is a complex extracellular structure that plays important roles in plant growth and development (Humphrey and others 2007). It is also the first line of defense against pathogens (Ridley and others 2001). At the early stages of infection, phytopathogenic microorganisms produce enzymes capable of degrading the plant cell wall (Vorwerk and others 2004); among these enzymes, polygalacturonases (PGs) cleave the α -1, 4 glycosidic bonds present between the galacturonic acid units of homogalacturonan, the main component of pectin. PGs not only enable pathogens to enter, but also activate defense responses in the plant. These plant defense responses are triggered by fragments of homogalacturonans with a wide degree of polymerization of 3 to 15 residues called oligogalacturonides (α -1,4-D-oligo-GalUA) or OGs, which accumulate in the plant apoplast (Spiro and others 1998; Denoux and others 2008; Cabrera and others 2008). OGs actions include the production of reactive oxygen species, glucanases, chitinases, phytoalexins, and expression of inducible genes involved in the production of antimicrobial compounds (Ridley and others 2001; Nafisi and others 2007; Denoux and others 2008). In *Arabidopsis thaliana*, OGs induce the expression of several defense genes, including *PAD3*, which encodes the cytochrome P450 (CYP71B15) enzyme that catalyzes the last step in camalexin biosynthesis (Ferrari and others 2007). In addition to these defense events, OGs have also been shown to induce changes in plant growth and development (Mauro and others 2002; Spiro and others 2002). Treatment of bean plants with a decagalacturonide (OG₁₀) has shown a marked reduction in primary root growth and alterations in lateral root formation (Hernandez and others 2006). Increasing experimental evidence indicates that exogenously added OGs are able to antagonize the action of the phytohormone auxin (indole-3-acetic acid, IAA) (Ridley and others 2001; Hernández and others 2006). Since auxin plays an essential role in growth and developmental processes in plants, the changes effected by OGs in the root system architecture appear to be mediated at least in part by auxin signaling. Auxin controls many different aspects of plant development, recent reports has shown that these distinct auxin response contexts are defined by complex and inter-dependent relationships between auxin metabolism, transport and response (Kieffer and others 2010). Specifically, directional (polar) transport of the auxin between cells is a plant-specific form of developmental regulation. Transport-based asymmetric auxin distribution within tissues produces auxin gradients, which play important roles in many developmental processes, including cell patterning and tropisms (Tanaka and others 2006). IAA moves throughout the plant by phloem or by a more controlled polar transport system (PAT). PAT is a process regulated by AUXIN

RESISTANT 1/LIKE AUX1 (AUX1/LAX) uptake proteins, PIN-FORMED (PIN) efflux carriers, and P-GLYCOPROTEIN (MDR/PGP/ABCB) efflux/conditional transporters (Swarup and others 2001; Swarup and others 2004; Kleine-Vehn and others 2006; Wu and others 2007; Mravec and others 2008; Kieffer and others 2010). There are several Arabidopsis mutants defective on the production of auxin transport proteins or in the correct location of these proteins that show auxin-related phenotypes, including *aux1-7* and *doc1/tir3*. The *aux1-7* mutant is defective at the *AUX1* locus (Swarup and others 2001), while *doc1/tir3* is a mutant allele of *BIG*, which encodes a protein important for the correct location of the PIN1 auxin transport protein (Gil and others 2001). Respect to auxin signaling, intracellular auxin is perceived by the TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1/AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEIN 1-3 (TIR1/AFB1-3) receptors. TIR1 is part of the ubiquitin-ligase complexes known collectively as SCF^{TIR1/AFB} that catalyze the ubiquitination and destruction of AUXIN/INDOL-3-ACETIC ACID (AUX/IAA) proteins. These last proteins, under low auxin concentrations form dimmers with AUXIN RESPONSE FACTORS (ARF) transcription factors, thereby blocking the activity of ARFs. Once freed from the AUX/IAAs, these ARFs regulate the expression of auxin-responsive genes (Lau and others 2008; Kieffer and others 2009). Arabidopsis mutants affected in components of auxin signaling complexes, how *tir1-1* (Dharmasiri and others 2005) also shown auxin-related phenotypes. To date, the mechanisms underlying the antagonistic effect of OGs on auxin-induced responses remain unknown.

Many plants accumulate secondary metabolites in their tissues, possibly to protect the rapidly growing seedling from pathogen attack, which can also act as mediators of growth and developmental processes. Flavonoids, a class of phenol-like compounds produced by plants in response to developmental and environmental factors, are considered natural regulators of cellular auxin efflux and PAT (Brown and others 2001; Buer and Muday 2004; Peer and Murphy 2007). It was found that flavonoid treatment inhibits ABCB-mediated auxin transport in heterologous expression systems (Bouchard and others 2006; Bailly and others 2008). In *abcb4* and *abcb19* mutants, quercetin was accumulated at the same region where ABCB4 and ABCB19 would be localized (Titapiwatanakun and Murphy 2008). Since flavonoids are important negative regulators of PAT at the plasma membrane by inhibiting the activity of auxin transport proteins and OGs have been reported to affect auxin responses in plants, it seems possible that the relationship between OGs and auxin transport would be an important factor linking plant immunity to growth and development. However, the mechanisms involved in this interaction remain to be investigated.

In this study with the aim of testing a potential OGs-auxin interaction and its role in flavonoid biosynthesis and plant development, we evaluated the effects of oligogalacturonides (OGs), members of a class of defense stimulators, in Arabidopsis root system architecture. For reach that aim, gene expression and camalexin quantification in Arabidopsis wild-type plants treated with OGs were analyzed to determine *PAD3* accumulation and camalexin biosynthesis, two well known markers of defense responses. Besides, histochemical, molecular and fluorescence analyses in WT and mutant plants were used to determine if flavonoid accumulation is involved in auxin transport modulation in the primary root.

Materials and methods

Plant material and growth conditions.

WT *Arabidopsis thaliana* (Col-0 and *Ler* ecotypes) seedlings, *DR5::uidA* (Ulmasov and others 1997) transgenic line, and *tir1-1* (Dharmasiri and others 2005), *aux1-7* (Pickett and others 1990), *pgp4* (Terasaka and others 2005), *pgp1* and *pgp19* (Geisler and others 2003), *doc1/tir3* (Gil and others 2001), and *tt4-1* (from the ABRC at Ohio State University, At5G13930 CS85) mutant lines were used for the experiments. Seeds were surface disinfected with 1 ml 95% ethanol (v/v) for 5 min and 1 ml sodium hypochlorite 5% and SDS 10% solution. After six washes with 1 ml sterile distilled water and 2 days of stratification at 4°C, seeds were germinated and growth on agar plates containing 0.2X Murashige and Skoog medium (1962), (MS, Sigma), 2% Suc (w/v), pH 5.7, 200 µl/l vitamins stock (Thiamin 1mg/ml, Pyridoxine 5mg/ml and Nicotinic acid 5mg/ml) and 1% phytagar (Sigma). The medium was supplemented with 1-N-naphthylphthalamic acid (NPA, 10⁻⁶ M), the synthetic auxin naphthalene acetic acid (NAA, 10⁻⁶ M) and different concentrations of OGs ranging from 0.1 ng/ml to 100 ng/ml. Plates were placed in a vertically position to allow root growth along the agar surface in a chamber with photoperiod of 16 h light and 8 h darkness at 22-24 °C.

Isolation, inactivation and molecular analysis of OGs.

Cell walls preparation from French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) "Flor de Mayo". The plant material was obtained from seeds germinated in pots with aseptic moist in a growth chamber with 16 h light, 8 h dark at 22-24°C. Previously, the seeds were surface sterilized for 15 minutes at 5% NaOCl and then washed with abundant sterile distilled H₂O. Hypocotyls and epicotyls were collected from plants when the first foil emerged, freeze in liquid N₂ and stored at -70°C. Cell wall was prepared from 35g of freeze stems suspended in 500 ml 0.5 M Na₂HPO₄, pH 7.0, which was homogenized 2 min in Hi speed Washing blender. Suspension was centrifuged at 10,000 rpm for 15 min, 4°C. The pellet was washed twice more with the same solution and thrice more with deionized H₂O. The pellet was suspended in 500 ml boiling ethanol, was stirred for 1 h and was filtered on paper Wathmann # 3 to pick up the walls. These last, were resuspended in 500 ml of ethanol, and subsequently it was removed by suction. Cell wall sample was washed with 500 ml of chloroform:methanol (1:1 v/v), solution was drawn away by suction. Finally, cell wall was washed with 500 ml of acetone, solvent filtrated or drawn away by suction. The wall sample was dried by puffing air through it by suction for 1h.

α-D-oligogalacturonides (OGs) preparation.

OGs were obtained treating 0.30 g cell wall samples with 35 ml sodium acetate 50 mM, pH 4.0 buffer and 24.5 units of pectinase from *Rhizopus sp.* (Sigma). The sample was stirred with a glass spindle by 1 min., incubated at 25°C during 1 h and centrifuged at 100 rpm. Sample was filtrated on Whatmann #3 paper. The solution was carried to boiling in a water bath by 5 min. Cold solution was centrifuged 5 min at 5000 rpm, the supernatant volume was reduced to 1 ml under vacuum and evaporation at 40°C. Sample was loaded on chromatography Bio-gel P6 medium (Bio-Rad) matrix column (1 X 132 cm) previously equilibrated with deionized water. The sample was eluted with degassed-deionized water.

Finally, 2 ml fractions were collected and galacturonate content was spectrophotometrically determined ($\lambda=525$ nm) in a reaction mix with sodium tetraborate and carbazol, according to carbazol modified method (Davidson 1966). Sample was separated in four peaks (fractions 15-27 **I**, 28-31**II**, 32-35 **III**, 37-41 **IV**). Fractions from each peak were joining; concentration of each pool was adjusted to 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ and elicitor activity determined. Due to the highest activity for to elicit phaseollin production, peak III was selected and purified by filtration in Bio-gel P4 medium column (1 X 140 cm) equilibrated and eluted with degassed-deionized water. Pool III was resolved into six peaks as determined by galacturonate content. Fractions in each peak were pooled and were named as IIIa thru IIIf, and activity was newly determined. Mol wt approximate of most active peak, IIId OGs, was determined by filtration on Bio-gel P4 medium column (0.7 X 228 cm) previously calibrated with manooligosaccharides of mol wt ranging from 504.5 (3mer) to 1801 (11mer) Da in addition of mannose (180.2 Da) y cyanocobalamin (1350 Da) (Cano and others 1994).

Inactivation of OGs was done by reducing its C-1 to a primary alcohol with sodium borohydride (OGs-R). OGs-R was prepared essentially according to the procedure described by Spiro and associates (Spiro and others 2002), and used as specificity control of OGs bioactivity.

Molecular analysis of OGs by MALDI TOF/TOF

Molecular analysis of the OGs was performed in a 4800 *plus* MALDI TOF/TOF analyzers company Applied Biosystems, under the following conditions: Positive mode with laser intensity of 4200 and 500 total shots/spectrum. 5 mg/ml of an α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix was used. OGs concentration was 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ and 1 μL of matrix-dry plus 1 μL sample-dry was applied.

Histochemical analysis

In order to analyze β -glucuronidase reporter gene activity (GUS), *CycB1::uidA* and *DR5::uidA* transgenic seedlings were incubated overnight at 37 °C in the reaction buffer (0.5 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide in 100 mM sodium phosphate). Seedlings presenting the blue characteristic staining reaction were subjected to tissue clarification, which consisted of incubating the seedlings in an acidic solution (HCl 0.24N in methanol 20%) during 60 minutes at 60 °C. Next, in 60% ethanol and 7% NaOH solution during 20 min at room temperature, followed by 40%, 20% and 10% ethanol treatments, 15 min each. Finally, the tissue was incubated overnight in 50% glycerol (Malamy and Benfey 1997a). At least, 20 seedlings were analyzed from each treatment in two independent experiments. Seedling images were captured using a camera adapted to a microscope UW (Nikon, Tokyo).

Root analysis

Analysis of root system architecture (RSA) from *Arabidopsis* seedlings were performed using a stereomicroscope (Iroscope ES-24, Leica). Lateral roots emerging from primary roots in WT and mutant seedlings were observed in a 4X objective, recording the total lateral root number. The primary root length was measured using a ruler in at least twenty

seedlings. The length of primary root meristem was determined as the length of cortex meristematic cell files from the stem cell niche to the transition zone where cells leave the meristem and enter at elongation zone of primary roots in WT (Col-0) plants. Cortical images were captured from the primary root differentiation zone of cleared seedlings using a camera connected to a microscope in order to determine its length (Ramírez-Chávez and others 2004). From the same zone of Col-0 plants, the lengths and numbers of root hairs were measured from photographs recorded with a digital camera connected to a microscope. Tissue clearing and mounting was performed as previously described (Malamy and Benfey 1997a). Independent cell measurements were done from at least 20 seedlings from two independent experiments. The root gravitropic response was determined in 3 day-old seedlings grown in vertical plates under the above conditions, and then for gravity-stimulation, the plates were turned 90° for 24 hours and measured the rotation angle of each root in order to determine the response to that stimulus.

Flavonoid fluorescence staining and quantification

Flavonoids were visualized *in vivo* by the diphenyl boric acid 2-amine ethyl ether (DPBA) fluorescence method. Five day-old *A. thaliana* Col-0 and *tt4-1* mutant seedlings grown in 10 ng/ml OGs were stained with DPBA and fluorescent staining of whole seedlings and quantification of fluorescent intensities was performed according to the procedure described by Buer and others (2007). Fluorescent intensities were analyzed from 20 independent seedlings in two independent experiments and representative photographs used to construct panel figures.

Camalexin determination

Camalexin extraction was done from three day-old seedlings grown in MS 0.2X medium with 10 ng/ml OGs or from rosette leaves from four weeks old *A. thaliana* plants growing in soil and sprayed with 1 ml 10 ng/ml OGs, OG-R and distilled water was used in control plants. 18 mg fresh-weight rosette leaves were used for phytoalexin extraction. The extraction was made essentially according to the procedure described in Glazebrook and Ausubel (1994). Camalexin concentration was calculated by comparison with a standard curve obtained by using purified camalexin kindly provided by Professor J. Glazebrook (University of Maryland). This analysis was performed using three samples from each condition in two independent experiments.

Real Time qRT-PCR analysis of *PAD3* gene expression

Total RNA was isolated using TRIzol (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. qRT-PCR was performed using the Superscript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR kit (Invitrogen) and the Applied Biosystems 7500 Real Time PCR machine. The thermal cycling program was as follows: 50°C for 30 min and 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 1 min, and a one-cycle dissociation stage at 95°C for 15 s, 60°C for 1 min, and 95°C for 15 s. The primers used were: *Actin2* (At3g18780), 5'-CGTACAACCGGTATTGTGCTGGAT-3' and 5'-CCCCAGCTTTTAAAGCCTTT-3'; *PAD3* (At3g26830), 5'-TGCTCCCAAGACAGACAATG-3' and 5'-GTTTTGGATCAG ACCCATC-3'. *Actin2* was used as the internal reference gene, and expression values were

normalized to those of *Actin2*. After the establishment of a dynamic range and validation of endogenous control, an analysis of relative quantification of the genes in the different conditions was performed. Data were then subjected to analysis of variance in a completely randomized design, and the treatment means separated by Duncan's multiple range tests.

Statistical analysis

For all experiments, the overall data was statistically analyzed with the SPSS 10 program (SPSS Inc., Chicago). Univariate and multivariate analyses of variance (ANOVA) and post-hoc Tukey tests were used for testing differences in cellular and developmental traits under OGs treatments in WT and mutant plants. Different letters are used to indicate means that differ significantly ($P < 0.05$).

Results

OGs induces camalexin accumulation and *PAD3* expression

Phytoalexins are low molecular weight antimicrobial compounds produced by plants in response to pathogen attack. In *Arabidopsis*, large amounts of the phytoalexin camalexin are produced in response to attack by bacterial or fungal pathogens (Glazebrook and Ausubel 1994; Nafisi and others 2007). To test the effect of OGs on camalexin production, we evaluated camalexin accumulation in both 3 day-old *Arabidopsis* seedlings grown *in vitro* and in rosette leaves of adult WT (Col-0) plants grown in soil, which were treated with 10 ng/ml OGs for different time points. Camalexin fluorospectrometry quantification analyses showed a significant accumulation of camalexin at 24 h after treatment in plants from the two experimental conditions (Fig. 1A and C). To determine the specificity of OGs bioactivity, the accumulation of camalexin was also tested in response to inactive OGs, which reducing end had been chemically reduced by sodium borohydride (OGs-R). Camalexin accumulation was absent in *Arabidopsis* seedlings treated with OGs-R for 24 h (Fig. 1B). To determine whether camalexin production elicited by OGs is associated with the induction of the camalexin biosynthetic gene *PAD3*, which encodes a cytochrome P450 monooxygenase, and catalyzes the last step in camalexin biosynthesis (Ferrari and others 2007; Nafisi and others 2007), we used quantitative RT-PCR (qRT-PCR) to monitor expression of this gene over the course of OGs induction in *Arabidopsis* WT plants grown in soil. The levels of *PAD3* expression were determined immediately after OGs treatment and 6, 24, and 48 h later. As shown in Fig. 1D, the expression of *PAD3* was clearly induced in plants at 24 and 48h after treatment and correlates with camalexin accumulation (Fig. 1A, B and C). These data show that OGs are able to elicit defense responses in *Arabidopsis*.

OGs alters *Arabidopsis* root system architecture

The root system is an essential part of the plant, which provides anchorage and plays an important role in water and nutrient uptake. The primary root is formed during embryogenesis; in contrast, lateral roots and root hairs are formed post-embryonically and increase the exploratory capacity of the root system (Malamy and Benfey 1997a; Parker and others 2000; López-Bucio and others 2005; Osmont and others 2007).

To determine whether activation of defense responses by OGs could alter plant growth and developmental processes, the changes in root system architecture in *Arabidopsis* seedlings grown in agar plates containing MS 0.2X medium with active OGs were evaluated. Seedlings were germinated and grown in vertically oriented Petri dishes containing 0.2X MS agar media with OGs concentrations ranging from 0.1 to 100 ng/ml. A remarkable effect on the *Arabidopsis* root architecture by inhibiting primary root growth and promoting lateral root formation was observed (Fig. 2 A-D). To more closely analyze the effects of OGs on root development; primary root length, number of emerged lateral roots, and lateral root density were quantified in *Arabidopsis* seedlings grown under the same conditions. After 10 days of growth, it was observed that treatments of 1, 10 and 100 ng/ml OGs had a dose dependent effect on primary root growth, in which a 100 ng/ml concentration showed a 28% inhibition of growth (Fig. 3A). Interestingly, OGs treatments induced more lateral roots to form, suggesting a compensatory effect of the elicitor on lateral organs (Fig. 3B). The density of lateral roots was also calculated by dividing the number of lateral roots by the length of the primary root to normalize for the effects of OGs on primary root length. These results also showed a dose-dependent increase in lateral root density in seedlings treated with OGs when compared with the control (Fig. 3C).

Effect of OGs on root hair development

Root hairs are tubular outgrowths of root epidermal cells that play a role in water and nutrient acquisition. Root hair formation has been reported to be affected by auxin (Parker and others 2000). Therefore, the possibility was open that root hair development could also be altered by OGs. To analyze if the oligogalacturonides could alter root hair development, *Arabidopsis* seedlings were grown on the surface of solidified MS 0.2X medium supplied with different concentrations of OGs. Root hair parameters including trichoblast length, and root hair number and length were analyzed at 6 days of growth on primary roots of control and OGs-treated plants. Our data show that OGs treatments decreased trichoblast length (Fig. 4A), which was related to a substantial increase in both the number and length of root hairs, except at 100 ng/ml, which was inhibitory (Fig. 4B and C). In these experiments, the most evident effect was observed in roots grown in 10 ng/ml OGs, in which a three-fold increase in root hair length could be observed when compared to the control (Fig. 4C). These results show that trichoblast length and root hair development are also modulated by OGs, perhaps as part of the compensatory growth mechanisms, which are activated after primary root growth inhibition.

OGs alters cell elongation

To determine whether OGs treatments could alter root development by altering cell division, the length of the primary root meristem was determined in WT (Col-0) seedlings as the length of cortex meristematic cell files from the stem cell niche to the transition zone (TZ) where cells leave the meristem and enter at the elongation zone of primary roots in WT (Col-0) plants (Fig. 5A). These results show that OGs treatment does not alter cell proliferating activity in the primary root meristem of *Arabidopsis*. Cell elongation was analyzed by measuring cortical cell size in the differentiation and maturation regions of primary roots in WT (Col-0) plants. Interestingly, the elongation zone length showed a

significant decrease in plants treated with 10 and 100 ng/ml OGs (Fig. 5B). Therefore, the observed inhibitory effect of OGs on primary root growth seems to be caused by an inhibition of cell elongation.

Involvement of auxin in Arabidopsis responses to OGs

The effects of OGs on root development observed in this study are similar to that described for auxin in plants (Casimiro and others 2001). Since auxin controls plant morphogenesis via its activity gradients and local auxin maximum as a result of auxin metabolism and predominantly of intercellular auxin transport, we next tested whether OGs could alter auxin responses in Arabidopsis roots. To address this, auxin response was monitored by using the auxin-inducible marker gene *DR5::uidA* (Ulmasov and others 1997). Figure 6 shows histochemical staining for transgenic *DR5::uidA* plants that were grown 8 days under naphthalene acetic acid (NAA), 1-N-naphthylphthalamic acid (NPA) or OGs treatments. As previously reported (Ulmasov and others 1997), in untreated control plants *DR5::uidA* was expressed in the primary root meristem and the elongation zone corresponding to the provasculature in root tips (Fig. 6A). When *DR5::uidA* seedlings were exposed to auxin treatment, we found that a concentration of 10^{-6} M NAA induced an extended GUS activity, which correlated with prolific root hair development close to the root tip (Fig. 6B). In contrast, PAT inhibition by treatment with 10^{-6} M NPA lead to enhanced *DR5::uidA* expression in the QC and columella cells but decreased expression in provasculature (Fig. 6C). Interestingly, *DR5::uidA* plants grown in a concentration of 10 ng/ml OGs showed both a reduced GUS activity in the QC, columella and provasculature cells when compared to the control (Fig. 6D). These data suggest that OGs did not increase auxin responsiveness in primary root tips, but instead, it actually decreases auxin responses as revealed by marker-regulated gene expression.

PAT mutants show differential responses to root architecture changes induced by OGs

The comparative effects between OGs and NPA on auxin responses in the root tip suggest that these compounds act in a different way to alter auxin signaling in Arabidopsis. To explore the role of auxin transport and signaling in mediating the effects of OGs on root architecture adjustment, we analyzed primary root growth response of Arabidopsis WT Col-0 and mutant seedlings defective on auxin transport: *aux1-7*, *doc1*, *pgp1*, *pgp4*, *pgp19*, and on auxin signaling, *tir1-1*. As shown in Figure 7, the mutant defective in the auxin influx carrier *aux1-7* showed similar primary root growth inhibition when treated with 10 ng/ml OGs compared to WT seedlings, indicating that this mutant is equally sensitive to OGs as the WT. In contrast, the mutant lines *doc1*, *pgp1*, *pgp4*, *pgp19* and *tir1-1*, showed decreased primary root growth both in the presence or absence of OGs, indicating that these genes are important for root growth independently of OGs supply and both auxin transport and signaling are involved in the effect promoter of OGs on root development (Fig. 7).

Root architecture responses induced by OGs in flavonoid mutants

We also tested the growth response of the *transparent testa* mutant *tt4-1* (Fig. 8), which is defective on flavonoid biosynthesis to investigate if OGs could affect auxin distribution and signaling via synthesis of flavonoids. Flavonoids have been implicated as natural

regulators of auxin transport *in vivo* and absence of flavonoids in this mutant line results in elevated auxin transport (Murphy and others 2000; Peer and others 2004; Buer and Muday 2004). The results revealed that *tt4-1* mutant seedlings show a general primary root growth inhibition (Fig. 8A); instead, we found that the seedlings were specifically resistant to the inhibitory effects of OGs treatment on root growth; including emerged lateral root (Fig. 8B) and lateral root density (Fig. 8C). This suggests that flavonoids are involved in the regulation of root system development by OGs.

OGs-induce flavonoid accumulation in primary root tips

The result that *tt4-1* is resistant to OGs-mediated root architectural changes prompted us to determine whether OGs may affect flavonoid accumulation. We performed experiments to determine if OGs could induce flavonoid accumulation in WT and *tt4-1* plants (Fig. 9A). Flavonoids can be visualized using diphenyl boric acid 2-amino ethyl ester (DPBA), a flavonoid-specific dye (Buer and others 2007). In Arabidopsis, DPBA forms a fluorescent complex with quercetin and kaempferol generating golden and green fluorescence, respectively (Buer and others 2007). WT (Col-0) seedlings grown without 10 ng/ml OGs showed flavonoid fluorescence in all three assayed zones from the seedling, namely the cotyledons, the hypocotyl-root junction zone and the cell elongation zone of the primary root. Interestingly, OGs treatment increased the fluorescence signal in all three evaluated tissues of the plant, while in *tt4-1* mutant seedlings, no fluorescence signal was found in all three evaluated tissues (Fig. 9A). In *tt4-1* seedlings, it was only observed a red autofluorescence distinctive of chlorophyll in cotyledons.

In this work we also evaluated whether the flavonoid pattern accumulation in roots of Col-0 seedlings treated with OGs correlates with sites of low auxin accumulation. To this end, we tested DR5 seedlings treated with OGs for display GUS expression and flavonoid fluorescence (Fig. 9B); the data revealed that the pattern of accumulation of flavonoids in the root not coincides with some regions of GUS expression, mainly in the root elongation zone (Fig. 9B). This strengthens the hypothesis about the apparent modulation of auxin transport by flavonoids accumulated in seedling treated with OGs. This paper also analyzed the root gravitropic response of Col-0 seedlings to OGs, in order to determine whether OGs can regulate root gravitropism through modulation of auxin transport by the accumulation of flavonoids. To this end, we evaluated the gravity response in roots of Col-0 seedlings grown with OGs, a condition in which flavonoids are synthesized and accumulated (Fig. 9A). The gravitropism is a complex response that enhances the ability of plants to grow vigorously in response to changing environmental conditions (Blancaflor and Masson 2003), and generally is known as a response to lateral auxin transport through the organ stimulated by gravity (Muday 2001). The data obtained from this analysis revealed that, under these conditions, the roots exhibit a delayed gravitropic response (Fig. 9C). This indicates that OGs treatment can modulate the rate of root gravity response, suggesting that the synthesis of flavonoids by OGs is an important factor for the action of the elicitor, possibly acting as an intermediary that regulates auxin distribution and action in the root system.

Discussion

Defense-related responses in plants are stimulated by molecules known as elicitors. A number of reports have shown that OGs, a class of compounds derived from cell wall hydrolysis in plant-microbe interactions, which play a role as elicitors, may also act as signals for plant growth and development (Ridley and others 2001; Hernandez and others 2006; Ferrari and others 2008). However, the cellular and physiological processes that are responsible of developmental responses to these elicitors remain to be clarified. Here, we used *Arabidopsis thaliana* as a model to investigate the effects of OGs on auxin responses and root system architecture.

In preceding results, Denoux and others (2008) showed that OGs play an important role in mediating resistance to the necrotrophic fungus *B. cinerea*. This resistance was found to be dependent on *PAD3* gene expression and camalexin accumulation. Phytoalexins are low molecular weight antimicrobial compounds that are synthesized in response to pathogen attack. The phytoalexin camalexin, an indole derivative, is also produced by *Arabidopsis* in response to infection with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* (Zhou and others 1999). The *PAD3* protein encodes a cytochrome P450 monooxygenase, which catalyzes the last step in camalexin biosynthesis. In this work, we found that OGs treatment induced camalexin accumulation in *Arabidopsis* seedlings, which correlated with increased expression of *PAD3* (Fig. 1C), showing that oligogalacturonides were active as elicitor and that plants treated with these compounds activated their defense response. Interestingly, we found that these molecules acting to very low concentrations, in contrast it reported in other plant system, where have been used high concentrations of OGs (Ferrari and others 2008).

We presented evidence that OGs disturbs the *Arabidopsis* root architecture by inhibiting primary root growth and inducing the formation of new lateral roots (Figs. 2 and 3). This last appears to be a global effect on cell growth and differentiation processes involving the entire root system, since root hair formation and elongation was also induced after treatment with the defense elicitor in a dose-dependent way (Fig. 4). The effect of OGs on the root of *Arabidopsis*, contrast with previous results found on development of root bean (Hernandez and others 2006), where OG decreased both the length of principal root as number lateral root. We believe that such variations are due to that both plant systems were tested in conditions completely different; such variations ranging from germination, medium and type of cultivation, concentration and exposition time of tissues to the OGs, making it impossible the comparison between them.

The root system displays considerable plasticity in its morphology and physiology in response to variability within its environment (Malamy and Benfey 1997b; Parker and others 2000; López-Bucio and others 2005; Osmont and others 2007). Lateral roots are formed from pericycle cells, which proliferate to give rise to a new lateral organ, which extends the length of the root system. Root hairs are extensions of single epidermal cells, which are formed on the surface of both primary and lateral roots and comprise as much as 77% of the total root surface area of cultivated crops, forming the major point of contact between the plant and the rhizosphere (Parker and others 2000). Both lateral roots and root hairs play a pivotal role in rhizosphere processes including anchorage to the soil and uptake of water and nutrients.

Interestingly, the decreased primary root growth observed in OGs treated seedlings was not related to alterations in cell division but rather was caused by significant reduction in cell elongation (Fig. 5), with a further induction of differentiation processes, namely increased lateral root and root hair formation. Although these root architectural effects are similar to those observed in plants when they are treated with auxins, OGs treatment did not increase *DR5::uidA* expression in primary root tips, indicating that the primary root growth inhibition effect was not caused by increased auxin response at this region (Fig. 6). In contrast, reduced *DR5::uidA* expression in OGs treated primary roots correlated with increased expression of this marker in developing lateral roots (data not shown), suggesting that increased growth of lateral roots may be mediated by altered auxin distribution or altered response to auxin (Fig. 6 and 7).

The similar reported effects of phytohormones such as NPA, a widely used auxin transport inhibitor with those of OGs on root cell patterning, namely decreased primary root growth and alteration of auxin distribution in root tips, supports the hypothesis that inhibition of auxin flow plays a role in RSA adjustment by OGs. Although OGs effects suggest an alteration on auxin transport, one important difference in the mode of action of the elicitor when compared to NPA is that NPA, along with an inhibitory effect on primary root growth, leads to inhibition in lateral root development, while OGs promote lateral root formation. This difference can be the result of the fact that the “global” NPA treatment would block auxin efflux in all plant tissues sensitive to NPA (Swarup and others 2004), which guide the auxin efflux, whereas OGs could affect specifically certain subgroup of the NPA binding proteins or ABC glycoproteins. This difference suggests therefore that the mechanism by which OGs could be altering auxin transport is not identical to that of the chemical inhibitor NPA, but they might rather share some targets of regulation.

Certain flavonoids, especially quercetin and kaempferol, exert an antagonist effect on auxin transport by direct interaction with the NPA-binding protein of auxin transporters and multi-drug resistance (MDR), transporters also termed ABC transporters (Brown and others 2001). The effects of OGs on primary root growth in WT and on auxin transport mutants *aux1-7*, *doc1*, *pgp1*, *pgp4* and *pgp19* revealed complementary interactions in the genetic responses to the elicitor. The *aux1-7* mutant, which showed altered gravitropism and decreased primary root growth in medium without OGs, showed a significant further reduction in growth in response to the elicitor (Fig. 7). In contrast, all three *pgp1*, *pgp4* and *pgp19* mutants, all of which are considered targets of flavonoid inhibition of root basipetal transport, showed decreased primary root growth when grown in MS medium and in medium supplied with OGs, indicating that these genes are required for normal root growth, in the same way that the auxin signaling gene *tir1-1*, where the primary root growth was the same in seedlings treated with and without OGs.

Flavonoids are secondary metabolites found throughout the plant kingdom, where they have diverse roles. Two particular functions of flavonoids are relevant to the present work: the role played in defense (Denoux and others 2008) and the role played in auxin transport (Peer and Murphy 2007). Flavonoid accumulation in different plant regions was increased with OGs treatment, including the hypocotyl/root junction and the primary root elongation region (Fig. 9A). In Arabidopsis, the flavonoid pathway is well characterized at the genetic, enzymatic and product levels (Glazebrook and Ausubel 2004; Buer and others

2007). The *Arabidopsis thaliana transparent testa (tt)* mutants are compromised in the enzymatic steps or transcriptional regulators affecting flavonoid biosynthesis. Interestingly, the stimulatory effect of OGs on flavonoid accumulation was absent in the *transparent testa* mutant *tt4-1*, which is defective in the chalcone synthase enzyme mediating the conversion of 4-coumaril-CoA to naringenin chalcone (Fig. 8). This mutant was also found to be resistant to growth inhibitory effect induced by OGs treatment in the primary root growth, providing genetic evidence of the role played by flavonoid biosynthesis in mediating the OGs root architectural responses. These results show the importance of flavonoids in root development and are in agreement with previous developmental analysis in *tt4* mutants (Buer and Muday 2004). Recently, Buer and others (2009), revealed a wide variety of architectural phenotypes in root and aerial tissues in *Arabidopsis tt* mutants, including increased inflorescences, siliques and lateral roots. Further analysis of *tt4* demonstrated that flavonols can act in specific cell files in the root to modulate the gravitropic response, which is in agreement with previous findings (Buer and Muday 2004). It is also of interest to note that increased concentrations of OGs caused alterations in the gravitropic response that could be due to specific flavonoid accumulation in the root elongation zone (Fig. 9C). Several mechanisms regulate auxin transport during root gravitropism; one is the targeting of auxin efflux PIN3 protein to unique membranes in response to gravitropic stimulation. The second is the reversible protein phosphorylation, which modulates the activity, abundance or localization of auxin transport proteins and finally the localized synthesis of flavonoids that regulate auxin transport to modulate the rate of gravity response (Buer and others 2006).

On the other hand, would be interesting to analyze the effect on the levels of IAA synthesis, due to camalexin synthesis enhanced by OGs. We think it is possibly that the IAA levels could decrease in OGs presence, due to both, IAA and camalexin have at indole acetaldoxima indole (IAOx) as an intermediate in common (Zhou and others 1999; Sugawara and others 2009).

Based on these analyses, we conclude that OGs are capable of regulating defense responses and root morphogenetic processes in *Arabidopsis thaliana*, inducing flavonoid accumulation at the root elongation region of the primary root and likely affecting auxin distribution and action within the root system. The combined effects of these responses in plants may ultimately determine the adaptive capability of the plant when exposed to pathogens or symbionts.

Acknowledgments

We thank Professors Angus Murphy for *pgp1*, *pgp4* and *pgp19* mutant seeds and Jane Glazebrook for providing camalexin standard and extraction methodology. Dra. Rosa Elva del Río Torres, Dra. Lourdes Macias Rodriguez and Kanek Ballesteros are thanked for excellent technical support in the chemical inactivation of OGs, interpretation of analysis MALDI TOF/TOF and photographic work respectively. This research was supported in part by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, grant no. 47239) and Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (grant no. CIC 2.11).

References

Bailly A, Sovero V, Vincenzetti V, Santelia D, Bartnik D, BW Koenig, Mancuso S, Martinoia E, Geisler M (2008) Modulation of P-glycoproteins by auxin transport inhibitors is mediated by interaction with immunophilins. *J. Biol. Chem.* 283: 21817-21826.

Blancaflor EB, Masson PH (2003) Plant gravitropism. Unraveling the ups and downs of a complex process. *Plant Physiol.* 133: 1677-1690.

Bouchard R, Bailly A, Blakeslee JJ, Oehring SC, Vincenzetti V, Lee OR, Paponov I, Palme K, Mancuso S, Murphy AS, Schulz B, Geisler M (2006) Immunophilin-like TWISTED DWARF1 modulates auxin efflux activities of *Arabidopsis* P-glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 281: 30603-30612.

Brown DE, Rashotte AM, Murphy AS, Normanly J, Tague BW, Peer WA, Taiz L, Muday GK (2001) Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126: 524-535.

Buer CS, Muday GK (2004) The *transparent testa4* mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of *Arabidopsis* roots to gravity and light. *Plant Cell* 16: 1191-1205.

Buer CS, Sukumar P, Muday GK (2006) Ethylene modulates flavonoid accumulation and gravitropic responses in root of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 140: 1384-1396.

Buer CS, Muday GK, Djordjevic MA (2007) Flavonoids are differentially taken up and transported long distances in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 145: 478-490.

Buer CS, Muday GK, Djordjevic MA (2009) Architectural phenotypes in the *transparent testa* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 60:751-763.

Cabrera JC, Boland A, Messiaen J, Cambier P, Van Cutsem P (2008) Egg box conformation of oligogalacturonides: The time-dependent stabilization of the elicitor-active conformation increases its biological activity. *Glycobiol.* 18: 473-482.

Cano H, Zavala G, López-Romero E, Soriano E (1994) Oligosaccharides of plant and fungal origin elicit phaseolin accumulation with similar kinetics in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. *Rev. Mex. Fitopatol.* 12: 162-173.

Casimiro I, Marchant A, Bhalerao RP, Beeckman T, Dhooge S, Swarup R, Graham N, Inzé D, Sandberg G, Casero PJ, Bennett MJ (2001) Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* 13: 843-852.

Davidson EA (1966) Analysis of sugars found in mucopolysaccharides. *Meth. Enzymol.* 8: 52-60.

Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 441–445.

Denoux C, Galletti R, Mammarella N, Gopalan S, Werck D, De Lorenzo G, Ferrari S, Ausubel FM, Dewdney J (2008) Activation of defense response pathways by OGS and Flg22 elicitors in *Arabidopsis* seedlings. *Mol. Plant* 3: 423-445.

Ferrari S, Galletti R, Denoux C, De Lorenzo G, Ausubel FM, Dewdney J (2007) Resistance to *Botrytis cinerea* induced in *Arabidopsis* by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene or jasmonate signaling but requires *Phytoalexin Deficient3*. *Plant Physiol.* 144: 367-379.

Ferrari S, Galletti R, Pontiggia D, Manfredini C, Lionetti V, Bellincampi D, Cervone F, 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.

Geisler M, Kolukisaoglu HU, Bouchard R, Billion K, Berger J, Saal B, Frangne N, Koncz-Kalman Z, Koncz C, Dudler R, Blakeslee JJ, Murphy AS, Martinoia E, Schulz B (2003) TWISTED DWARF1, a unique plasma membrane-anchored immunophilin-like protein, interacts with *Arabidopsis* multidrug resistance-like transporters *AtPGP1* and *AtPGP19*. *Mol. Biol. Cell* 14: 4238-4249.

Gil P, Dewey E, Friml J, Zhao Y, Snowden KC, Putterill JP, Palme K, Estelle M, Chory J (2001) BIG: a calossin-like protein required for polar auxin transport in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 15: 1985-1997.

Glazebrook J, Ausubel FM (1994) Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8955-8959.

Herms DA, Mattson WJ (1992) The dilemma of plants: to grow or defend. *Quart. Rev. Biol.* 67: 283-335.

Hernández GM, Sepulveda B, Richards A, Soriano E (2006) The architecture of *Phaseolus vulgaris* root is altered when a defense response is elicited by an oligogalacturonide. *Braz. J. Plant Physiol.* 18: 351-355.

Humphrey TV, Bonetta DT, Goring DR (2007) Sentinels at the wall: cell wall receptors and sensors. *New Phytol.* 176: 7-21.

Kieffer M, Neve J, Kepinski S (2010) Defining auxin response contexts in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 12-20.

Kleine-Vehn J, Dhonukshe P, Swarup R, Bennett M, Friml J (2006) Subcellular trafficking of the Arabidopsis auxin influx carrier AUX1 uses a novel pathway distinct from PIN1. *Plant Cell* 18: 3170-3181.

Lau S, Jürgens G, De Smet I (2008) The evolving complexity of the auxin pathway. *Plant Cell* 20: 1738-1746.

López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Pérez-Torres A, Ramírez-Pimentel JG, Sánchez-Calderón L, Herrera-Estrella L (2005) Root architecture. In: Turnbull C. (Ed). *Plant architecture and its manipulation*. Oxford: Wiley-Blackwell Annual Review Series, p 181-206.

Mauro ML, De Lorenzo G, Costantino P, Bellincampi D (2002) Oligogalacturonides inhibit the induction of late but not of early auxin-responsive genes in tobacco. *Planta* 215: 494-501.

Malamy JE, Benfey PN (1997a) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124: 33-44.

Malamy JE, Benfey PN (1997b) Down and out in Arabidopsis: the formation of lateral roots. *Trends Plant Sci.* 2: 390-396.

Mravec J, Kubes M, Bielach A, Gaykova V, Petrášek J, Skůpa P, Chand S, Benková E, Zažímalova E, Friml J (2008) Interaction of PIN and PGP transport mechanisms in auxin distribution-dependent development. *Development* 135: 3345-3354.

Muday GK (2001) Auxins and tropisms. *J. Plant Growth Regul.* 20: 226-243.

Murphy AS, Peer WA, Taiz L (2000) Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Planta* 211: 315-324.

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

Nafisi M, Goregaoker S, Botanga Chr J, Glawischnig E, Olsen CE, Halkier BA, Glazebrook J (2007) Arabidopsis cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of Indole-3-Acetaldoxime in camalexin synthesis. *Plant Cell* 19: 2039-2052.

Osmont KS, Sibout R, Hardtke CS (2007) Hidden branches: developments in root system architecture. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 93-113.

Parker JS, Cavell AC, Dolan L, Roberts K, Grierson CS (2000) Genetic interactions during root hair morphogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell* 12: 1961-1974.

Peer WA, Bandyopadhyay A, Blakeslee JJ, Makam SN, Chen RJ, Masson PH, Murphy AS (2004) Variation in expression and protein localization of the PIN family of auxin efflux

facilitator proteins in flavonoid mutants with altered auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16: 1898-1911.

Peer WA, Murphy AS (2007) Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators?. *Trends Plant Sci.* 12: 556-563.

Pickett FB, Wilson AK, Estelle M (1990) The *aux1* mutation of *Arabidopsis* confers both auxin and ethylene resistance. *Plant Physiol.* 94: 1462-1466.

Ramírez-Chávez E, López-Bucio J, Herrera-Estrella L, Molina-Torres J (2004) Alkamides isolated from plants promotes growth and alters root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134: 1058-1068.

Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochem.* 57: 929-967.

Spiro MD, Ridley BL, Eberhard S, Kates KA, Mathieu Y, O'Neill MA, Mohnen D, Guern J, Darvill A, Albersheim P (1998) Biological activity of reducing-end-derivatized oligogalacturonides in tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 116: 1289–1298.

Spiro MD, Bowers JF, Cosgrove DJ (2002) A comparison of oligogalacturonide-and auxin-induced extracellular alkalization and growth responses in roots of intact cucumber seedlings. *Plant Physiol.* 130: 895-903.

Sugawara S, Hishiyama S, Jikumaru Y, Hanada A, Nishimura T, Koshiba T, Zhao Y, Kamiya Y, Kasahara H (2009) Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 106: 5430–5435.

Swarup R, Friml J, Marchant A, Ljung K, Sandberg G, Palme K, Bennett M (2001) Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes Dev.* 15: 2648-2653.

Swarup R, Kargul J, Marchant A, Zadik DP, Rahman A, Mills R, Yemm A, May ST, Williams L, Millner P, Tsurumi S, Moore I, Napier R, Kerr ID, Bennett MJ (2004) Structure-function analysis of the presumptive *Arabidopsis* auxin permease AUX1. *Plant Cell* 16: 3069-3083.

Tanaka H, Dhonukshe P, Brewer PB, Friml J (2006) Spatio temporal asymmetric auxin distribution: A means to coordinate plant development. *Cell Mol. Life Sci.* 63: 2738-2754.

Terasaka K, Blakeslee JJ, Titapiwatanakun B, Peer WA, Bandyopadhyay A, Makam SN, Lee OR, Richards EL, Murphy AS, Sato F, Yazaki K (2005) PGP4, an ATP binding cassette P-glycoprotein, catalyzes auxin transport in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Cell* 17: 2922-2939.

Titapiwatanakun B, Murphy AS (2008) Post-transcriptional regulation of auxin transport proteins: cellular trafficking, protein phosphorylation, protein maturation, ubiquitination, and membrane composition. *J. Exp. Bot.* 60: 1093-1107.

Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle T (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9: 1963-1971.

Vorwerk S, Somerville S, Somerville C (2004) The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends Plant Sci.* 9: 203-209.

Wu G, Lewis DR, Spalding ER (2007) Mutations in Arabidopsis Multidrug Resistance – Like ABC transporters separate the roles of acropetal and basipetal auxin transport in lateral root development. *Plant Cell* 19: 1826-1837.

Zhou N, Tootle TL, Glazebrook J (1999) Arabidopsis *PAD3*, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Cell* 11: 2419-2428.

Figure legends

Fig. 1. Effects of OGs and reduced OGs-R on camalexin accumulation and *PAD3* expression. Three day-old Arabidopsis Col-0 seedlings were transferred for the indicated times to MS medium with 10 ng/ml OGs, A); 10 ng/ml OGs-R and water treatment as control, B); C) Rosette leaves of adult WT (Col-0) plants were sprayed with 10 ng/ml OGs or water and harvested at the indicated times after treatment for camalexin determinations. D) Quantitative-Real Time Polymerase Chain Reaction (q-RT-PCR) analysis of *PAD3* expression level at various times in response to 10 ng/ml OGs treatment. Plant material was processed as indicated in C and q-RT-PCR analysis performed using three independent samples from each treatment. Values shown in A, B and C represent the mean of 20 seedlings \pm SD. Different letters represent means statistically different at the 0.05 level. The experiment was repeated twice with similar results.

Fig. 2. Effects of OGs on Arabidopsis growth and development. A-E) Wild-type (Col-0) seedlings were grown for 10 d under increasing OGs concentrations or water treatment on vertically oriented agar plates. Representative photographs were taken from at least 20 plants analyzed. The experiment was repeated three times with similar results.

Fig. 3. Effects of OGs on Arabidopsis root system architecture. Wild-type (Col-0) seedlings were grown for 10 d under increasing OGs concentrations or water treatment on vertically oriented agar plates. Data are given for A) the length of the primary root, B) lateral root number per seedling and C) Emerged lateral root density. Values shown represent the mean of 20 seedlings \pm SD. Different letters represent means statistically different at the 0.05 level. The experiment was repeated twice with similar results.

Fig. 4. Effects of OGs on root hair development. A) Trichoblasts length, B) Root hair number, and C) Root hair length. *A. thaliana* Col-0 seedlings were grown for 6 d on MS 0.2X medium supplemented with the indicated concentrations of OGs. Data points indicate mean of 20 seedlings \pm SD. The results show mean of 10 epidermal cells located in the root hair forming zone of the primary root. Different letters indicate statistical differences at $P < 0.05$. The experiment was repeated twice with similar results.

Fig. 5. Effects of OGs on cell division and elongation in the primary root. Col-0 seedlings were grown for 8 d under increasing OGs concentrations or water treatment on vertically oriented agar plates, Col-0 seedlings were cleared and determinations were done for A) the number of meristem cortex cells, and B) the length of cortical cells. Values shown represent the mean of 20 seedlings \pm SD. Different letters represent means statistically different at the 0.05 level. The experiment was repeated twice with similar results.

Fig. 6. Effect of OGs on auxin response in Arabidopsis primary root tips. A) Twelve hours of GUS staining of *DR5::uidA* primary roots grown for 8 d on MS 0.2X medium supplied with water; B) with 10^{-6} M NAA; C) 10^{-6} M NPA or with D) 10 ng/ml OGs. Photographs are representative individuals of at least 15 plants stained. The experiment was repeated twice with similar results.

Fig. 7. Primary root growth response of WT (Col-0) and auxin-related mutants to OGs. Col-0 and *aux1-7*, *doc1*, *pgp1*, *pgp4*, *pgp19* and *tir1* mutant seedlings were grown for 8 d in 10 ng/ml OGs or water containing-media on vertically oriented agar plates and the length of the primary root determined for 20 seedlings. Values shown represent the mean \pm SD. Different letters represent means statistically different at the 0.05 level. The experiment was repeated twice with similar results.

Fig. 8. Effect of OGs on *tt4-1* mutant root system architecture. *A. thaliana* WT (*Ler*) and *tt4-1* seedlings were grown for 8 d in MS 0.2X medium supplied with 10 ng/ml OGs or water on vertically oriented agar plates. A) The length of the primary root, B) Lateral root number per seedling, and C) Emerged lateral root density. Values shown represent the mean of 20 seedlings \pm SD. Different letters represent means statistically different at the 0.05 level.

Fig. 9. Effect of OGs on flavonoid accumulation in Arabidopsis seedlings. A) Arabidopsis WT (Col-0), *tt4-1* and B) *DR5::uidA* seedlings were grown for 5 d in MS 0.2X medium supplied with 10 ng/ml OGs or water on vertically oriented agar plates. The seedlings were loaded with DPBA and fluorescence determined on an epifluorescence microscope, in addition, *DR5::uidA* seedlings were stained for GUS activity and cleared to show gene expression. Representative photographs were taken from at least 20 plants analyzed. Flavonoid fluorescence in Col-0 seedling cotyledons, the hypocotyl-root junction zone, and the cell elongation zone of the primary root (Fig. 9A); *DR5::uidA* GUS expression and flavonoid fluorescence in root meristems (Fig. 9B). C) 3 day-old Arabidopsis seedlings were grown in MS 0.2X medium supplied with 10 and 100 ng/ml OGs or water on

vertically oriented agar plates. The plates were turned 90° for 24 hours and measured the rotation angle of each root in order to determine the root gravity response. The experiments were repeated twice with similar results.

Supplemental Fig. S1.

Molecular analysis of OGs by MALDI TOF/TOF. The chromatogram showing the profile of the OGs mixture used in this work. The clauses indicate the peak corresponding to OGs with a degree of polymerization ranging from 7 to 10.

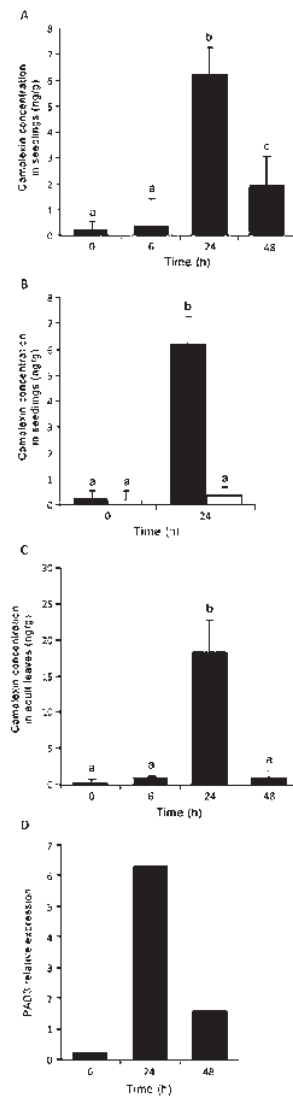


Figure 1

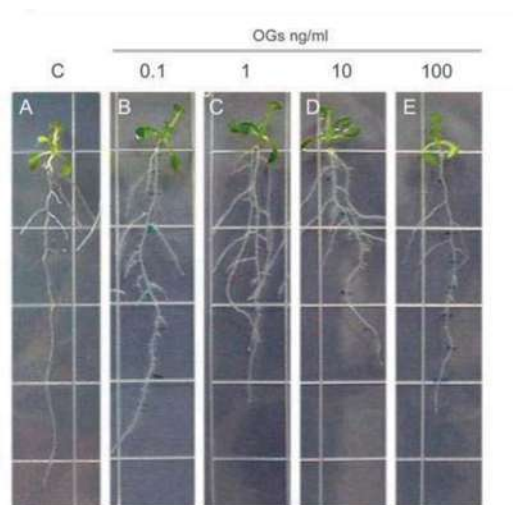


Figure 2

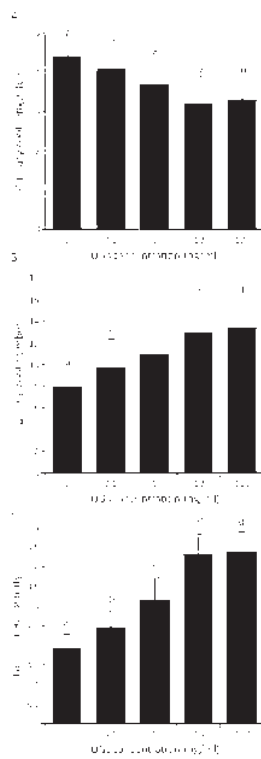


Figure 3

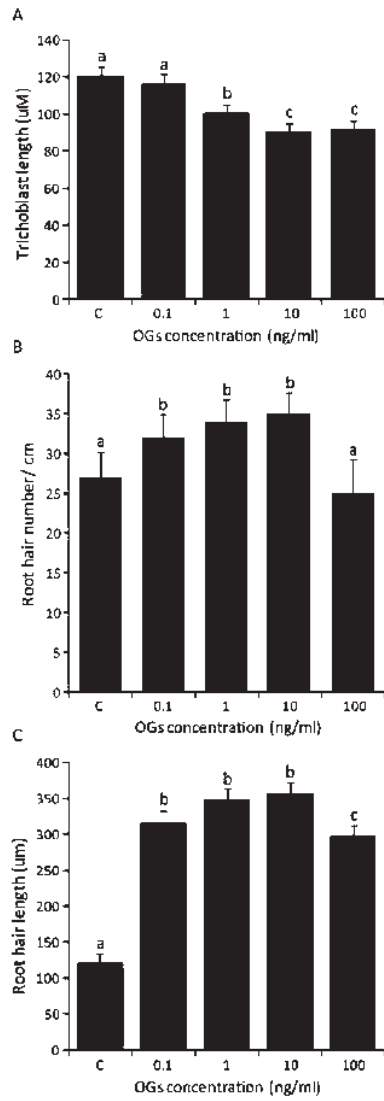


Figure 4

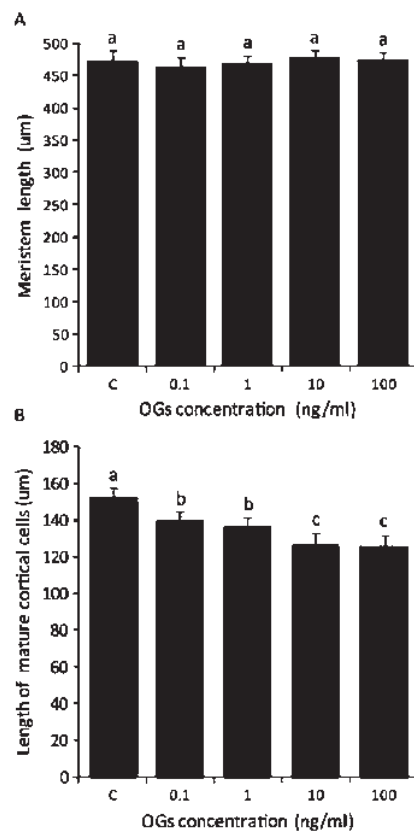


Figure 5

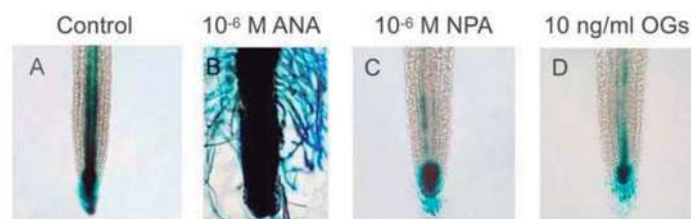


Figure 6

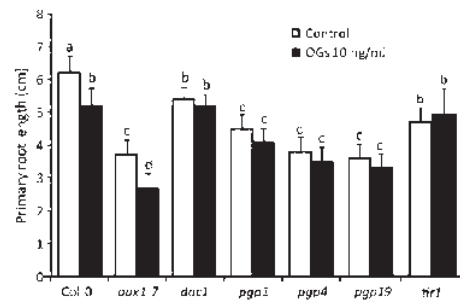


Figure 7

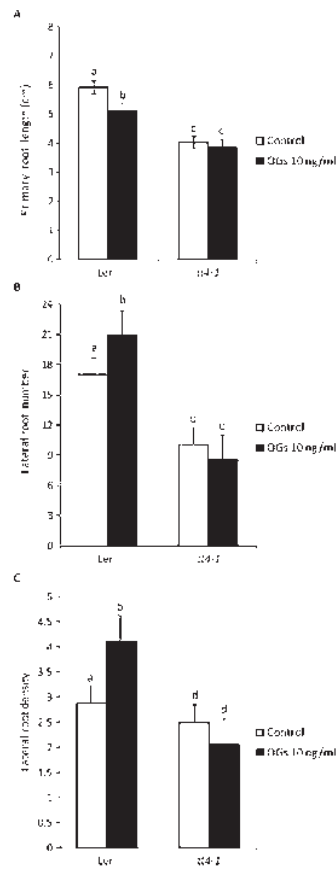
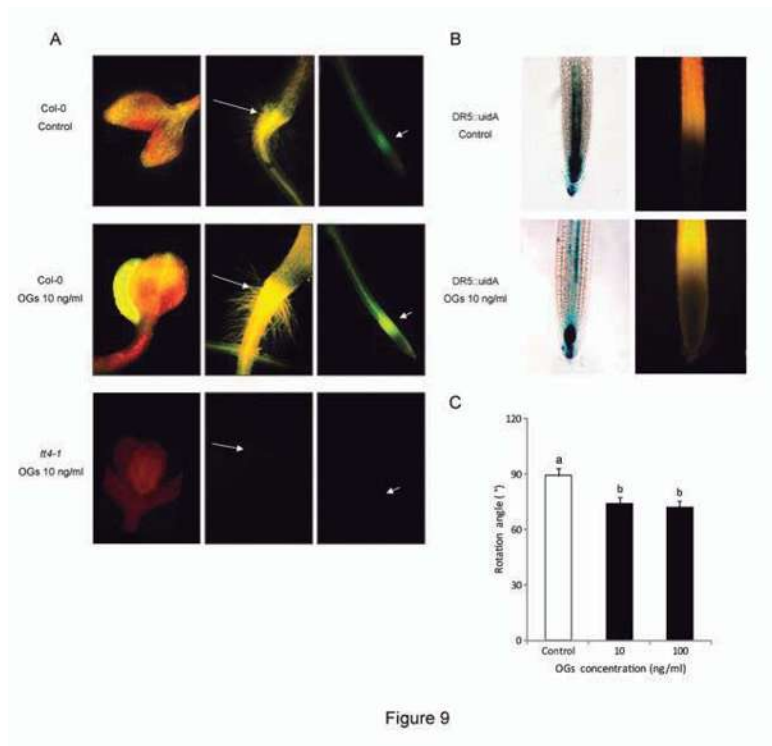


Figure 8



CAPÍTULO 2

LA ACTIVACIÓN DE LA DEFENSA POR OGAs AFECTA LA RESPUESTA A AUXINAS Y LA ARQUITECTURA DE LA RAÍZ AL ACTIVAR LA SÍNTESIS DE FLAVONOIDES EN *Arabidopsis thaliana*.

Georgina Hernández-Mata, María Elena Mellado-Rojas, Alan Richards, Elda María Beltrán-Peña y Eva Luz Soriano-Bello. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Edificio B3, UMSNH. Morelia, Mich. México. Tel. (01443) 326 5788 ext. 112.

Resumen

Las plantas responden a estímulos bióticos y abióticos regulando parámetros celulares y de desarrollo. Los oligo- α -galacturonidos (OGAs) son moléculas derivadas de la degradación de los homogalacturonanos de la pared celular de la planta durante su interacción con microorganismos patógenos. Estas moléculas, al ser reconocidas por la planta, estimulan un gran número de respuestas de defensa, y a su vez inducen cambios en el desarrollo vegetal.

En este trabajo se analizó el efecto de un decagalacturonido (OGA_{10}) en el crecimiento y desarrollo de la raíz de plántulas de *Arabidopsis thaliana*. Se encontró que concentraciones micromolares de OGA_{10} incrementan la expresión de *PAD3* y *CHS*. Asimismo, observamos que el tratamiento inhibió el crecimiento de la raíz primaria, promoviendo la formación de raíces laterales. OGA_{10} modifica la arquitectura del sistema radicular de *Arabidopsis thaliana* por un mecanismo novedoso que involucra la activación de genes para la síntesis de compuestos de defensa, así como de compuestos fenólicos que alteran el transporte polar de auxina en la raíz. Además su efecto fue similar al de inhibidores sintéticos del transporte de auxina NPA y TIBA, en términos del crecimiento de la raíz principal. Nuestros resultados sugieren que OGA_{10} podría llevar a cabo una función dual en la adaptación de las plantas al desafío por patógenos induciendo la defensa y ajustando la arquitectura de la planta al alterar el transporte y/o distribución de la auxina.

Palabras Clave: Oligogalacturonidos, *Arabidopsis thaliana*, desarrollo de la raíz, transporte de auxina, flavonoides.

Abstract

Plants respond to biotic and abiotic stimuli by regulating cellular and developmental parameters. Oligogalacturonides (OGs) are molecules derived from plant cell wall degradation during its interaction with pathogen microorganisms. These molecules are recognized by plant cells and stimulate a number of defense responses, which in turn, lead to changes in plant development. In this report, we evaluated the effect of a

decalacturonide (OG₁₀) isolated from bean plants in defense and developmental responses of *Arabidopsis thaliana* seedlings. It was found that micro molar concentrations of OG₁₀ increase *PAD3* and *CHS* expression. Furthermore, we observed that OG₁₀ treatment inhibited primary root growth and promoted lateral root formation. The effect of OG₁₀ on *Arabidopsis thaliana* root system architecture modification involved synthesis of defense and phenolic compounds and was similar to exogenous application of NPA and TIBA, a polar auxin transport inhibitors. Our results suggest that OG₁₀ might play a dual function in adaptation of plants to pathogen challenge by inducing defense and plant architecture adjustment.

Key Word: Oligogalacturonides, *Arabidopsis thaliana*, root development, polar auxin transport, flavonoids.

Introducción

La pared celular de la planta es una estructura compleja, que juega un papel importante en el crecimiento de planta y el desarrollo (Humphrey *et al.* 2007) y consiste en una barrera estructural contra organismos intrusos (Ridley *et al.* 2001). En el inicio de la infección, los microorganismos en su intento por penetrar a la célula, degradan la pared celular al liberan enzimas como glucanases y pectinoliases (Vorwerk *et al.* 2004), algunos de los fragmentos liberados pueden ser percibidos por la planta como un estímulo de defensa y activar la transcripción de genes de defensa (Jones y Dangl 2006).

Los ácidos oligogalacturonidos (α -1,4-D-oligo-GalUA, OGAs) producido por la hidrólisis parcial del homogalacturonano de la pared celular por endopoligalacturonasas (Spiro *et al.* 2002) inducen la síntesis de especies reactivas de oxígeno, glucanases, quitinasas y fitoalexinas (Ridley *et al.* 2001). En *A. thaliana*, los OGAs inducen la expresión de diversas proteínas y de genes de defensa (Ferrari *et al.* 2007) entre los que se encuentra *PAD3*, el cual codifica para la síntesis del citocromo P450, CYP71B15 el cual cataliza el último paso en la ruta de síntesis de la fitoalexina camalexina.

Además de la inducción de respuestas de defensa, los OGAs puede alterar el crecimiento y el desarrollo vegetal; evidencias experimentales indican que los OGAs modifican el crecimiento a través de un mecanismo que altera la acción de la auxina (Ridley *et al.* 2001, Hernández *et al.* 2006). Al parecer, la activación de la inmunidad basal en plantas, implica la represión de respuesta por auxinas (Navarro *et al.* 2006). Recientemente, se ha propuesto que las plantas cuando están expuestas a algún tipo de estrés, redirigen su crecimiento a través de alteraciones en la elongación y división celular, así también se inducen cambios en el estado de diferenciación de la planta, todo ello como una estrategia de aclimatación que asegura la supervivencia de la planta (Potters *et al.* 2007). Aparentemente, esto ocurre por un mecanismo molecular común para varios tipos de estrés, el cual incluye la producción de especies reactivas de oxígeno, alteraciones metabólicas y de transporte de fitohormonas. Sin embargo, el mecanismo a través del cual los OGAs alteran las respuestas inducidas por la auxina aún es desconocido.

La auxina natural el ácido-3-indolacético (AIA) es un factor clave en el crecimiento y desarrollo vegetal (Normanly *et al.* 2004). Para inducir sus efectos, el AIA debe ser distribuido a través de la planta por el floema o bien por un sistema de transporte

controlado con estricta direccionalidad, dado célula a célula por dos sistemas de transporte, el de entrada de auxina a la célula y el que facilita su salida (Blakeslee *et al.* 2005, Michniewicz *et al.* 2007). El transporte polar de auxinas (PAT) genera la acumulación local de la hormona en las diferentes células y tejidos, influenciando diferentes aspectos del desarrollo como son la formación del eje embrionario, el desarrollo de órganos, el mantenimiento de meristemas, las respuestas trópicas y de crecimiento a estímulos ambientales (Vieten *et al.* 2007, Michniewicz *et al.* 2007). Estas acumulaciones locales (gradientes) se han observado a través del uso de diferentes herramientas moleculares, tales como el promotor sintético de respuesta a auxina DR5 fusionado a un gen reportero (Ulmasov *et al.* 1997). El análisis de plantas mutantes con alteraciones fenotípicas atribuidas a alteraciones en el PAT, ha permitido la caracterización de tres familias de proteínas transportadoras codificadas por los genes AUX, PIN y ABC (glicoproteínas-P/MDR) (Blakeslee *et al.* 2005).

Los flavonoides, una clase de metabolitos secundarios tipo fenol que son sintetizados por las plantas por la ruta metabólica fenilpropanoide una vez que se activa la expresión del gene *CHS*, han sido considerados como inhibidores endógenos del transporte de auxina (Besseau *et al.* 2007, Peer y Murphy, 2007) y su mecanismo de acción es similar al del inhibidor sintético del transporte de auxina, el ácido naftilftalámico (NPA), (Peer *et al.* 2004), se ha reportado que su blanco de acción son las proteínas de membrana plasmática conocidas como proteínas de unión al NPA (NBP). Interesantemente, se ha reportado que la actividad de las glicoproteínas-P/MDR membranales es inhibida por el flavonoide quercetina (Geisler *et al.* 2005), por lo que se han propuesto como los blancos de acción de flavonoides. La purificación de diferentes miembros de la familia de glicoproteínas-P/MDR a partir de complejos de unión al NPA, permitió confirmar su papel como proteínas transportadoras, posiblemente estabilizando el sistema de eflujo membranal por su actividad transportadora dependiente de ATP (Blakeslee *et al.* 2005).

Parece ser que la relación que existe entre los efectos inducidos por OGAs y los inducidos por auxinas son factores importantes en la regulación de las respuestas de defensa, crecimiento y desarrollo vegetal. Sin embargo, se desconocen los mecanismos involucrados en este proceso, específicamente, entre la iniciación de la resistencia de la planta al patógeno y la interacción con las respuestas hormonales. En este trabajo mostramos que la respuesta de *A. thaliana* al estímulo por OGA₁₀ involucra la activación de respuestas de defensa aunados a una serie de cambios en el crecimiento y desarrollo radical; El análisis de mutantes de *Arabidopsis* afectadas en el PAT y los tratamientos con inhibidores del transporte (NPA y TIBA), sugieren que los cambios en el desarrollo de la raíz probablemente son mediados por perturbaciones en la distribución de auxina, que al parecer son ocasionadas por la síntesis y acumulación de flavonoides.

Procedimiento Experimental

Material vegetal y condiciones de crecimiento.

Se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* Columbia Col-O para todos los experimentos, excepto en aquellos en los que se indica. Usamos también semillas de *A. thaliana* de las líneas mutantes *aux1-7* (Pickett *et al.* 1990), *pin1* (Galweiler *et al.* 1998), *eir1* (Roman *et al.* 1995) y *doc1* (Li *et al.* 1994). Las semillas se desinfectaron

superficialmente con etanol al 95% (v/v) y con la solución de hipoclorito de sodio 5% y SDS 10%. Después de 6 lavados con agua destilada estéril y 2 días de vernalización a 4⁰C, las semillas se sembraron para su germinación y crecimiento en cajas de Petri que contenían medio Murashige and Skoog (1962), (MS, Sigma) 0.2X, pH 5.7, 2% de Sacarosa (w/v) (Dubrovsky *et al.* 2006) adicionado con 200 µl/l de una solución stock de vitaminas (Tiamina, Piridoxina y Ac. Nicotínico) y 1% de fitoagar (Sigma) suplementado con diferentes concentraciones de OGA₁₀, de ácido naftalenacético (ANA), de ácido N-(1-naftilftalámico (NPA) y del ácido tri yodobenzoico (TIBA). Las cajas se colocaron de forma vertical para que el sistema radicular de las plántulas creciera sobre la superficie del medio en una cámara con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad a una temperatura de 22-24 °C.

Obtención de OGA₁₀.

El OGA₁₀ se obtuvo 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 columnas de Bio-Gel. En las muestras eluidas se determinó el contenido de ácidos galacturónidos por espectrofotometría ($\lambda=525$ nm) en la mezcla de reacción (tetraborato de sodio y carbazol). La concentración final de OGA₁₀ se determinó sustituyendo los datos de absorbencia en la fórmula: Absorbencia x Factor de la curva estándar x Factor de dilución = Concentración total (Cano *et al.* 1994).

Clareo de tejidos.

Este procedimiento consistió en incubar el tejido vegetal en una solución ácida (HCl 0.24N y metanol al 20%) por 60 min a 60°C, a continuación en una solución de etanol al 60% y NaOH 7% por 20 min a temperatura ambiente, para después incubar con soluciones de etanol al 40%, 20% y 10% durante 15 min en cada solución respectivamente. Finalmente se incubó el tejido toda la noche en glicerol al 50% (Malamy y Benfey, 1997).

Análisis del sistema radicular.

Las observaciones del sistema radicular de las plántulas de *A. thaliana* se hicieron con un estereomicroscopio (Iroscope ES-24). Las raíces laterales que emergieron de la raíz principal de plántulas Col-O y mutantes se observaron con el objetivo 4X obteniéndose el número total de raíces en cada una de las plántulas y la longitud de la raíz principal de cada plántula se determinó midiéndola con una regla. El número y estadio de desarrollo de primordios de raíz lateral se realizó de acuerdo a Zhang *et al.* (1999). Las diferentes determinaciones se llevaron a cabo en al menos 20 plántulas de dos experimentos independientes.

Análisis semicuantitativo de la expresión de genes por RT-PCR

Se extrajo RNA total con Trizol reagent (Life Technologies.) Consistió brevemente en homogenizar el tejido en Trizol, separar con cloroformo la fase orgánica e incubar con isopropanol, para posteriormente lavar el RNA con EtOH al 70%, resuspendiendo con agua grado biología molecular estéril. Se observó la integridad del RNA en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. La cuantificación se realizó con los datos de

absorbancia obtenidos en un espectrofotómetro a $\lambda=260$ nm. El análisis por RT-PCR semicuantitativo se llevó a cabo a partir de muestras de RNA de 600 ng de los tiempos 0, 0.5, 1, 3, 6, 24, 48, 72 y 96 horas, utilizando el kit SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum *Taq* de Invitrogen. Las condiciones de la reacción fueron: 30 min a 50°C, 5 min a 94°C y para la amplificación 35 ciclos: 15 seg a 94°C, 1 min a 67°C y 45 seg a 68°C. Las secuencias de los oligos fueron las siguientes: *PAD3*, 5'-CGTCCCCGTGGTCG CGATCTCTTCG-3' y 5'-TGCCAGCGACTCCACCAATCCCTGC-3'; *CHS*, 5'-GGCCA TCAAGGAGTGGGGCCAGCCC-3' y 5'-ACCCACAATGAGTGCGGCGGCC-3'; *UBQ5*, 5'-GGAAGAAGAAGACTTACACC-3' y 5'-AGTCCACACTTACCACAGTA-3'.

Resultados y Discusión.

OGA₁₀ induce la expresión de *PAD3* en *A. thaliana*.

En este trabajo investigamos el mecanismo a través del cual OGA₁₀ aislado de paredes celulares de plantas de frijol activa la defensa alterando el crecimiento y desarrollo vegetal en el sistema radicular de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Con este objetivo, evaluamos los niveles de expresión del gene de defensa *PAD3* por RT-PCR semicuantitativo en plántulas Col-O de 3 d de edad y en hojas de roseta de plantas adultas Col-O de 4 semanas de edad tratadas durante diferentes tiempos con 10⁻⁸ M de OGA₁₀ (Fig. 1). Los resultados obtenidos del análisis de expresión en plántulas mostraron que *PAD3* se expresa en todos los tiempos probados, con un pico de expresión 24 y 48 horas después del tratamiento con OGA₁₀. En hojas de roseta, la expresión del gene fue transitoria mostrando un pico de expresión 24 horas después del tratamiento con OGA₁₀. Estos resultados indican que el tratamiento con OGA₁₀ (10⁻⁸ M) es efectivo en activar la expresión del gene *PAD3*, y están acordes a reportes previos para el tratamiento con una mezcla de OGAs (10 a 15 fragmentos, Ferrari *et al.* 2007, 9 a 16 fragmentos Denoux *et al.* 2008). Esto es muy trascendental pues en *A. thaliana*, la expresión del gene *PAD3* es requerida para la resistencia a cepas del hongo necrotrófico *B. cinerea* (Ferrari *et al.* 2003). Los datos mostrados demuestran que OGA₁₀ es activo como estimulador de defensas y que las plantas de *Arabidopsis* tratadas con esta molécula activan su defensa.

Efecto de ANA en la arquitectura del sistema radicular de *A. thaliana*.

En este trabajo evaluamos la respuesta del sistema radicular al tratamiento con OGA₁₀ (ver capítulo 1). Después de 10 días de crecimiento se encontró que la arquitectura de la raíz presentaba cambios tanto en la raíz primaria como en las raíces laterales, encontrando que a 10⁻⁸ M de OGA₁₀ se inducía un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la raíz primaria, en tanto que se estimulaba el desarrollo de raíces laterales (capítulo 1). Posteriormente se investigó si los cambios en el crecimiento radicular se debían a alteraciones en el proceso de división y/o en la elongación celular y encontramos que el tratamiento con OGA₁₀ inhibe el proceso de elongación celular en la raíz primaria de *A. thaliana*, sin alterar la división celular (capítulo 1 y 2). Estos eventos de regulación del desarrollo vegetal son similares a los inducidos por las auxinas (Taiz y Zeiger, 2006), con el propósito de comparar los efectos inducidos por OGA₁₀ con los inducidos por la acción de las auxinas (fenocopia) en este modelo de estudio, evaluamos la respuesta del sistema radicular al

tratamiento con diferentes concentraciones de la auxina sintética ANA. Después de 10 días de crecimiento se encontró que bajo dichas condiciones la arquitectura de la raíz de las plantas presentaba cambios tanto en la raíz primaria como en las raíces laterales (Fig. 2). Específicamente, observamos un comportamiento clásico de respuesta a auxinas, en donde el crecimiento de la raíz primaria disminuye en relación al aumento en la concentración de la hormona (Fig. 2B) en tanto que el desarrollo de raíces laterales disminuye significativamente (Fig. 2C). Estos datos muestran claramente como la raíz de *A. thaliana* es un órgano capaz de percibir señales ambientales y de responder adecuadamente con cambios en su desarrollo, sin embargo, la respuesta del sistema radicular fue inversa a la observada por OGA₁₀, lo que refuerza la propuesta sobre un posible antagonismo reportado previamente (Bellincampi *et al.* 1996).

Efecto de NPA y TIBA en la arquitectura del sistema radicular de *A. thaliana*.

Como ya se mostró, OGA₁₀ inhibe el crecimiento de la raíz principal aumentando el número de raíces laterales en *A. thaliana* a 10⁻⁸ M, asimismo bajo estas mismas condiciones OGA₁₀ disminuye la expresión del marcador de auxinas DR5 en el meristemo de la raíz principal, en contraste con un aumento en la expresión del marcador en la punta de las raíces laterales (ver capítulo 1), lo que sugiere una alteración en la distribución o en la respuesta a auxinas. Con el propósito de analizar el papel del transporte de auxinas en los cambios en la arquitectura de la raíz inducidos por OGA₁₀, se probaron los ácidos triyodobenzoico (TIBA) y naftilftalámico (NPA) (Katekar y Geissler 1980) para inhibir el transporte de auxinas en plantas silvestres y mutantes de *A. thaliana* y se comparó la respuesta del fenotipo con la inducida por OGA₁₀. El análisis del efecto de NPA sobre el crecimiento de la raíz primaria de plántulas Col-O mostró un resultado de disminución en la longitud de la raíz la cual fue dosis-dependiente (Fig. 3A y B), efecto que fue similar al inducido por TIBA (Fig. 3C y D). Sin embargo, estos efectos fueron distintos a los inducidos por OGA₁₀, ya que las concentraciones que estimularon la inhibición del crecimiento de la raíz también inhibieron el desarrollo de raíces laterales, esto sugiere que el mecanismo de acción a través del cual OGA₁₀ altera el transporte de auxina no es el mismo que el de los inhibidores químicos NPA y TIBA, sin embargo cabe la posibilidad de que compartan algunos blancos de regulación.

Con el propósito de profundizar en dicho mecanismo molecular de acción de OGA₁₀, analizamos el crecimiento de la raíz de plántulas mutantes alteradas en el transporte polar de auxina en presencia de 10⁻⁸ M de OGA₁₀. Específicamente se evaluaron las raíces de las plántulas mutantes *aux1-7* afectada en el influjo o entrada de auxina a la célula, *eir1* y *pin1* afectada en el eflujo o salida de auxina de las células, así como también *doc1* afectada en la respuesta a la luz y a inhibidores del transporte de auxina.

Después de 10 días de crecimiento se observó la arquitectura de la raíz (Fig. 4A), posteriormente se midió la longitud de las raíces de plántulas silvestres Col-O observándose el efecto inhibitorio antes mencionado (capítulo 1), al compararlas con el crecimiento de las raíces de plántulas sin tratamiento (capítulo 1). Al evaluar los datos de la medición de la longitud de las raíces de las líneas mutantes se encontró que no había diferencia significativa en las mutantes *eir1*, *pin1* y *doc1*, mostrándose insensibles a la presencia de 10⁻⁸ M de OGA₁₀; en tanto que en las mutantes *aux1-7* se observó un efecto

inhibitorio en el crecimiento de la raíz principal, de forma similar al de las plántulas silvestres Col-O tratadas con OGA₁₀ (Fig. 5B). Los resultados del análisis de la mutante *doc1* demuestran que OGA₁₀ actúa como un inhibidor del transporte polar de auxinas en la raíz, sugiriendo además por los datos obtenidos de las mutantes *eir1* y *pin1* que el sitio de regulación se encuentra en la maquinaria de salida de auxina de la célula. Interesantemente, el análisis de la respuesta de las mutantes del transporte de auxina al tratamiento con NPA mostró un patrón de respuesta similar a cuando se trataron con OGA₁₀ (Fig. 4C), estos datos fortalecen la hipótesis sobre la alteración del PAT y los posibles blancos de regulación son las proteínas de eflujo de auxina.

OGA₁₀ induce la expresión de CHS en *A. thaliana*.

Con objeto de dilucidar la señal que media la regulación del transporte de auxinas en la raíz de *A. thaliana* por el OGA₁₀, los flavonoides surgen como candidatos potenciales, debido a que se ha demostrado que algunos de estos metabolitos se localizan en tejidos que transportan auxina en la raíz de *A. thaliana*, en donde ejercen su acción como moduladores negativos del PAT (Besseau *et al.* 2007, Peer y Murphy, 2007).

Los datos de este análisis demuestran que OGA₁₀ a la concentración inhibitoria del crecimiento de la raíz principal (10⁻⁸ M), ejerce un fuerte impacto sobre la ruta de biosíntesis de flavonoides (capítulo 1), sin embargo, la regulación de la expresión del gene *CHS* por OGA₁₀, el cuál codifica para la primera enzima de la ruta de síntesis de flavonoides en *A. thaliana*, no se conocía, por lo que analizamos si la acumulación de flavonoides en la raíz de *A. thaliana* por el tratamiento con OGA₁₀ a 10⁻⁸ M (capítulo 1), está acompañada por el incremento en los niveles de RNAm del gene *CHS*. Para llevar a cabo este análisis, aislamos RNA total de plántulas crecidas durante diferentes tiempos en OGA₁₀ a 10⁻⁸ M (6, 24 y 48 horas) y analizamos por RT-PCR semicuantitativo los niveles de expresión del gene. Los resultados mostraron que el gene *CHS* se expresa en todos los tiempos probados en plantas tratadas y sin tratamiento (Fig. 1), sin embargo, en plántulas tratadas durante 24 h con OGA₁₀, su expresión se incrementó significativamente. Los resultados sugieren que la síntesis de estos compuestos es clave en el mecanismo de acción del estimulador, posiblemente la inhibición del PAT en la raíz de *A. thaliana* por OGA₁₀, se debe a la acción de los flavonoides que se acumulan en presencia del estimulador.

Material suplementario

Figura S1. Efectos de OGA₁₀ sobre la elongación de primordios de raíz lateral. Raíces primarias de 6 d edad fueron aclaradas y el número y la etapa de desarrollo de cada primordio de raíz lateral fue registrado. Los resultados muestran el número de primordios en cada etapa de desarrollo de acuerdo a Zhang *et al.* (1999), en 15 raíces individuales ± SD. Letras diferentes representan diferencias significativas a un nivel de 0.05.

Referencias.

- Blakeslee, J.J., Peer, W.A. y A.S. Murphy. 2005. **Auxin transport.** *Curr Opin Plant Biol* 8: 494-500.
- Bellincampi, D., Cardarelli, M., Zaghi, D., Serino, G., Salvi, G., Gatz, C., Cervone, F., Altamura, M.M., Costantino, P., G. De Lorenzo. 1996. **Oligogalacturonides prevent**

- rhizogenesis in rolB-transformed tobacco explants by inhibiting auxin-induced expression of the rolB gene.** *Plant Cell* 8: 477-487.
- Besseau, S., Hoffman, L., Geoffroy, P., Lapierre, C., Pollet, B. y M. Legrand. 2007. **Flavonoid accumulation in Arabidopsis repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth.** *Plant Cell* 19: 148-162.
- Cano, H., Zavala, G., López-Romero, E. y E. Soriano (1994). **Oligosaccharides of plant and fungal origin elicit phaseolin accumulation with similar kinetics in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants.** *Rev Mex Fitopatol* 12: 162-173.
- Dubrovsky, J.G., Gambetta, G.A., Hernández-Barrera, A., Shishkova, S. e I. Gonzalez. 2006. **Lateral root initiation in Arabidopsis: Developmental window, spatial patterning, density and predictability.** *Ann Bot.* 97: 903-915.
- Ferrari, S., Galletti, R., Denoux, C., De Lorenzo, G., Ausubel, F.M. y J. Dewdney. 2007. **Resistance to *Botrytis cinerea* induced in Arabidopsis by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene or jasmonate signaling but requires *PAD3*.** *Plant Physiol* 144: 367-379.
- Ferrari, S., Plotnikova, J.M., De Lorenzo, G. y F.M. Ausubel. 2003. **Arabidopsis local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires *EDS4* and *PAD2*, but not *SID2*, *EDS5* or *PAD4*.** *Plant J* 35:193-205.
- Galweiler L, Guan C, Muller A, Wisman E, Mendgen K, et al. 1998. **Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue.** *Science* 282: 2226-2230.
- Geisler, M., Blakeslee, J.J., Bouchard, R., Lee, O.R., Vincenzetti, V., Bandyopadhyay, A., Titapiwatanakun, B., Peer, W.A., Bailly, A., Richards, E.L., Ejendal, K.F., Smith, A.P., Baroux, C., Grossniklauss, U., Muller, A., Hrycyna, C.A., Dudler, R., Murphy, A.S. y E. Martionia. 2005. **Cellular efflux of auxin catalyzed by the Arabidopsis MDR/PGP transporter AtPGP1.** *Plant J* 44: 179-194.
- Hernández, G.M., Sepulveda, B., Richards, A. y E. Soriano. 2006. **The architecture of *Phaseolus vulgaris* root is altered when a defense response is elicited by an oligogalacturonide.** *Braz. J. Plant Physiol* 18: 351-355.
- Humphrey, T.V., Bonetta, D.T. y D.R. Goring. 2007. **Sentinels at the wall: cell wall receptors and sensors.** *New Phytol* 176: 7-21.
- Jones J.D.G y J.L. Dangl. 2006. **The plant immune system.** *Nature* 444: 323-329.
- Kliebenstein DJ (2004). Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. *Plant Cell Environ.* 27: 675-684.
- Katekar G. F. y A. E. Geissler. 1980. **Evidence of a common mode of action for a proposed class of auxin transport inhibitors: the phytotropins.** *Plant Physiol.* 66: 1190-1195.
- Li, H.M., Altschmied, L. y J. Chory. 1994. **Arabidopsis mutants define downstream branches in the phototransduction pathway.** *Genes and Dev* 8: 339-349.
- Malamy J.E. y P.N. Benfey. 1997. **Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*.** *Development* 124: 33-44.
- Michniewicz, M., Philip, B.B. y J. Friml. 2007). **Polar auxin transport and asymmetric auxin distribution.** En: **The Arabidopsis Book**, American Society of Plant Biologists. pp 1-28. doi:10.1199/tab.0108.

- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O. y J.D.G. Jones. 2006. **A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling.** *Science* 312: 436-439.
- Normanly, J., Slovin, J.P. y J.D. Cohen. 2004. **Auxin biosynthesis and metabolism.** In: **Plant Hormones: Biosynthesis, signal transduction, action!**. En: Davies P.J., Kluwer Academic Publishers pp 36-62.
- Peer W.A. y A.S. Murphy. 2007. **Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators?.** *Trends Plant Sci* 12: 556-563.
- Peer, W.A., Bandyopadhyay, A., Blakeslee, J.J., Makam, S.N, Chen R.J., Masson, P.H. y A.S. Murphy. 2004. **Variation in expression and protein localization of the PIN family of auxin efflux facilitator proteins in flavonoid mutants with altered auxin transport in *Arabidopsis thaliana*.** *Plant Cell* 16: 1898-1911.
- Pickett, F.B., Wilson, A.K. y M. Estelle. 1990. **The *aux1* mutation of *Arabidopsis* confers both auxin and ethylene resistance.** *Plant Physiol* 94: 1462-1466.
- Potters, G., Pasternak T.P., Guisez, Y., Palme, K.J. y M.A.K. Jansen. 2007. **Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble?.** *Trends Plant Sci* 12: 98-105.
- Ridley, B.L., O'Neill, MA. y D. Mohnen. 2001. **Pectins: Structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling.** *Phytochem* 57: 929-967.
- Roman, G., Lubarsky, B., Kieber, J.J., Rothenberg y J.R. Ecker. 1995. **Genetic analysis of ethylene signal transduction in *Arabidopsis thaliana*: five novel mutant loci integrated into a stress response pathway.** *Genetics* 139: 1393-1409.
- Spiro, M.D., Bowers, J.F. y D.J. Cosgrove. 2002). **A comparison of oligogalacturonide- and auxin-induced extracellular alkalization and growth responses in roots of intact cucumber seedlings.** *Plant Physiol* 130: 895-903.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G. y T. Guilfoyle. 1997. **Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements.** *Plant Cell* 9: 1963-1971.
- Taiz L. y E. Zeiger. 2006. **Auxin: The growth hormone.** En: **Plant Physiology.** *Sinauer Associates, Inc. Publishers* (Ed). Sunderland, Massachusetts, USA. pp 467-507.
- Vieten, M. Sauer, P., Brewer, B. y J. Friml. 2007. **Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development.** *Trends Plant Sci* 12(4): 160-168.
- Vorwerk, S., Somerville, S. y S. Somerville. 2004. **The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance.** *Trends Plant Sci* 9: 203-209.
- Zhang, H., Jennings, A., Barlow, P.W. y B.G. Forde. 1999. **Dual pathways for regulation of root branching by nitrate.** *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6529-6534.

Leyendas de las figuras

Figura 1. Expresión de *PAD3* y *CHS* en *A. thaliana* en respuesta a OGA₁₀. Expresión en plántulas de *A. thaliana* Col-O de 3 días de edad crecidas los tiempos indicados en MS 0.2X con 10⁻⁸ M de OGA₁₀ y en hojas de roseta de plantas adultas de 4 semanas de edad. Se extrajo RNA total en los tiempos indicados (horas) y el análisis de la expresión en cada muestra se llevó a cabo por RT-PCR semicuantitativo normalizando con la expresión de *UBQ5*.

Figura 2. Efecto de ANA en la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. **A**, Fotografías representativas de la arquitectura de las plántulas de *A. thaliana* Col-O de 10 días de edad crecidas en medio MS 0.2X, suplementado con las concentraciones de ANA indicadas. **B**, Longitud de la raíz principal, **C**, Número de raíces laterales. **D**, Densidad de las raíces laterales. Los valores representan el promedio de 20 plántulas \pm DE. Letras diferentes representan diferencias significativas (ANOVA $P < 0.05$).

Figura 3. Efecto de NPA y TIBA en la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. **a**) Fotografías representativas de las plántulas de *A. thaliana* Col-O de 10 días de edad crecidas en medio MS 0.2X, suplementado con diferentes concentraciones de NPA y **b**) TIBA. **c**) Longitud de la raíz principal de plantas crecidas en NPA y **d**) TIBA. Los valores representan el promedio de 15 plántulas \pm DE.

Figura 4. Efecto de OGA₁₀ y NPA en el crecimiento de la raíz de mutantes de *A. thaliana*. **A**, Fotografías representativas de las plántulas de *A. thaliana* Col-O y de mutantes *aux1-7*, *eir1*, *pin1* y *doc1* de 10 días de edad crecidas en medio MS 0.2X, suplementado con 10^{-8} M de OGA₁₀. **B**, Longitud de la raíz principal de mutantes crecidas en 10^{-8} M de OGA₁₀. **C**, Longitud de la raíz principal de mutantes crecidas en 10^{-5} M de NPA. Los valores representan el promedio de 20 plántulas \pm DE. Letras diferentes representan diferencias significativas (ANOVA $P < 0.05$).

Figura 1

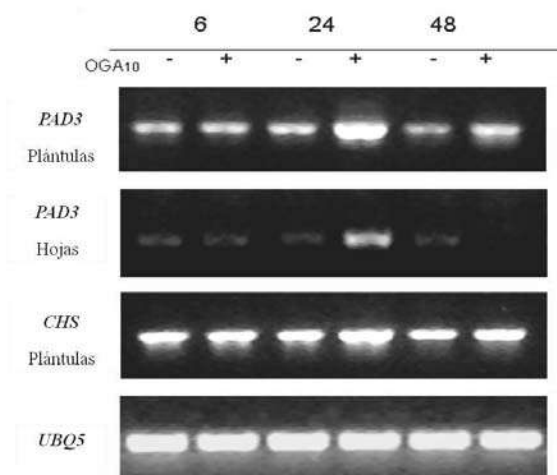
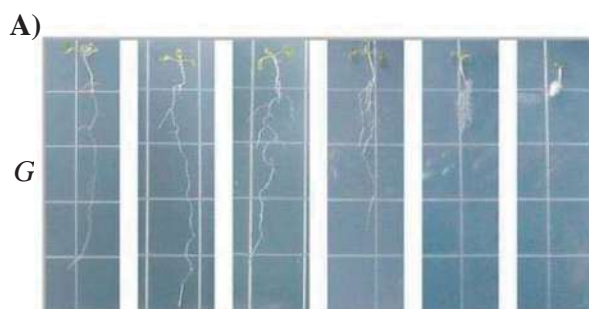


Figura 2.



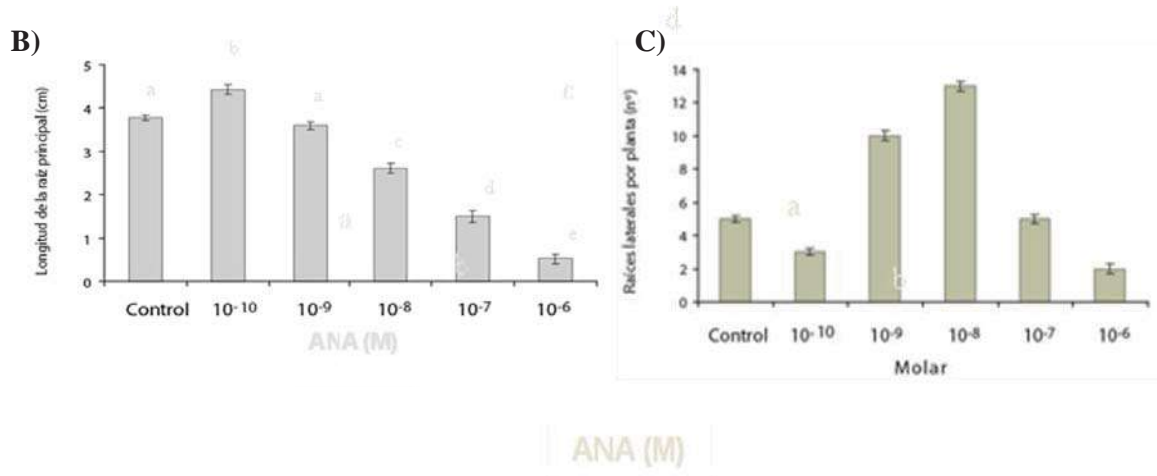


Figura 3.

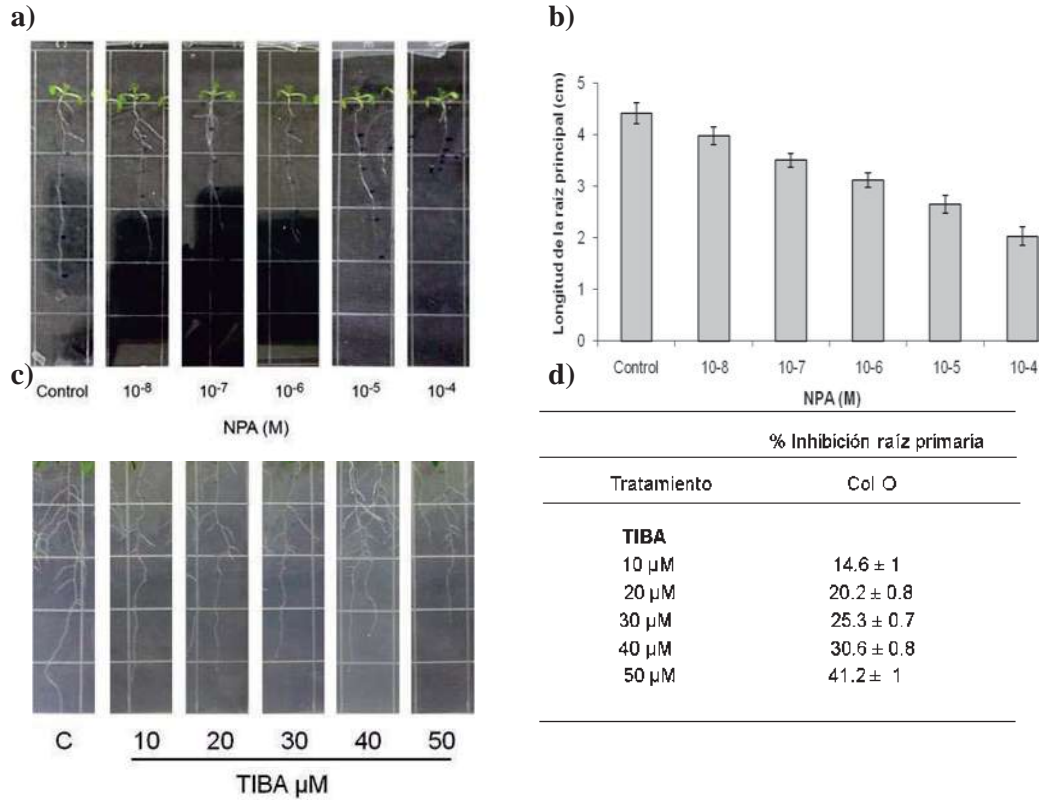


Figura 4

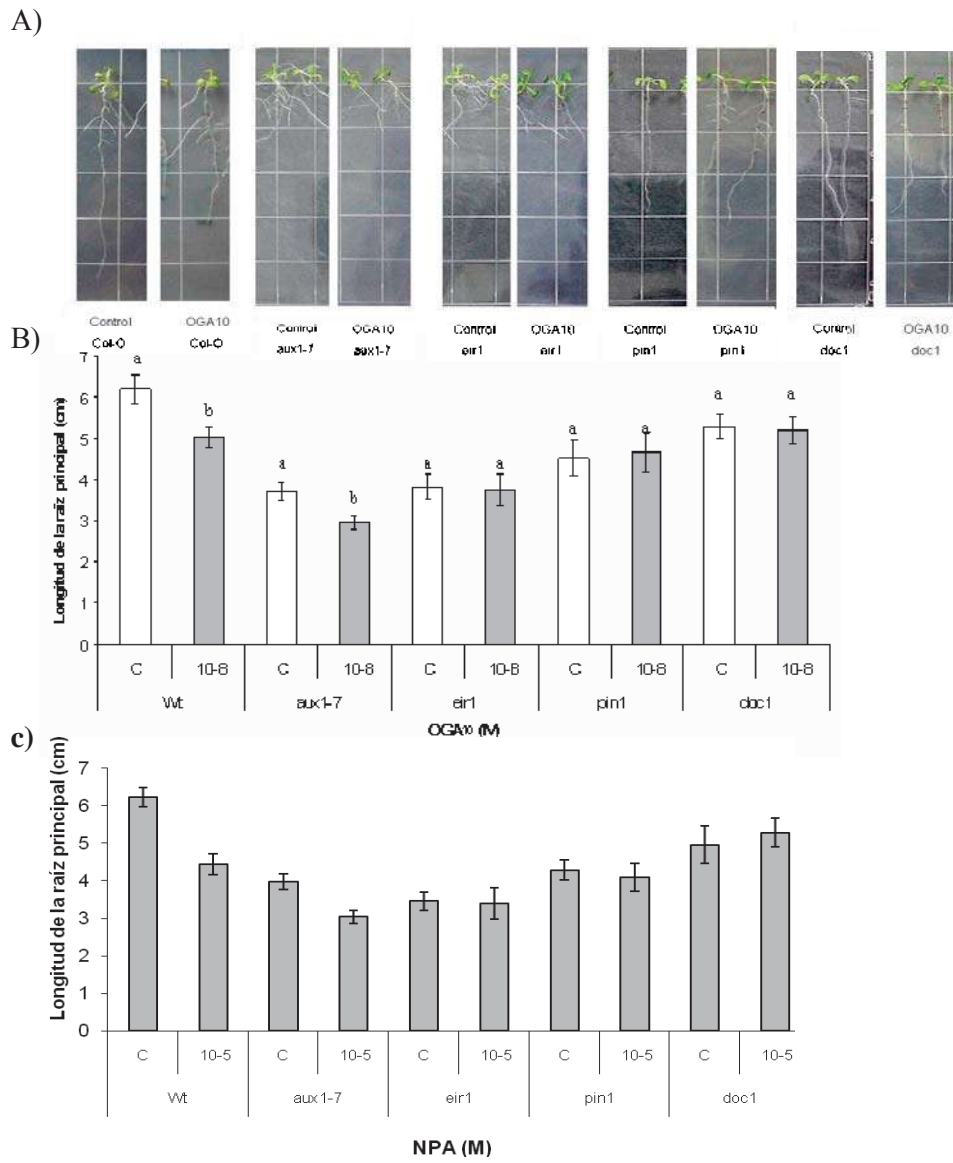
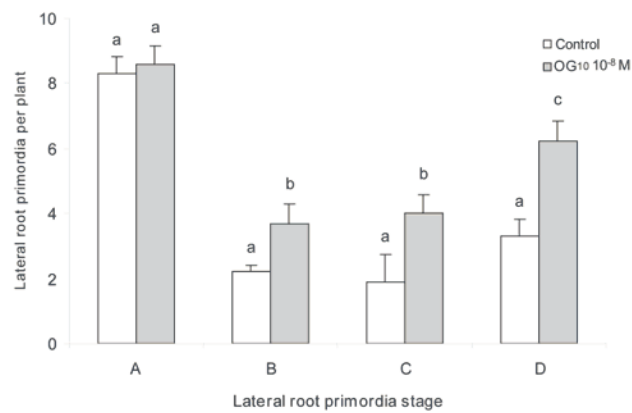


Figura S1.



VII. DISCUSIÓN GENERAL

Un gran número de trabajos experimentales han mostrado que los oligogalacturonidos (OGAs), una clase de compuestos derivados de la hidrólisis enzimática de la pared celular vegetal durante la interacción entre la planta y el patógeno, actúan como estimuladores endógenos de defensas. Asimismo, se ha reportado que los OGAs funcionan como moléculas de señalización para la regulación del crecimiento y desarrollo vegetal, ejerciendo un papel antagónico a la acción de la auxina (Ridley *et al.* 2001, Hernández *et al.* 2006, Ferrari *et al.* 2008). Los reportes sobre las observaciones del efecto inhibitorio en el crecimiento vegetal por este tipo de estimuladores, han despertado gran interés en determinar el mecanismo por el cual, el estímulo que señala un ataque por patógenos potenciales, puede alterar de manera inhibitoria el crecimiento en las plantas (Branca *et al.* 1988, Bellincampi *et al.* 1993, 1996, Hernández *et al.* 2006, Ferrari *et al.* 2007, 2008). A pesar de las implicaciones para el entendimiento de las interacciones planta-patógeno y la adaptación de las plantas ante este tipo de estrés, actualmente poco se sabe sobre los procesos celulares y fisiológicos que son responsables de las respuestas a estos estimuladores.

Con ese objetivo, en este trabajo fueron utilizadas plantas de *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio para investigar el mecanismo de acción a través del cual el estimulador de defensas OGA₁₀, incide en las respuestas a auxina y por tanto, en la arquitectura del sistema radicular. Primeramente mostramos que el tratamiento con 10⁻⁸ M de OGA₁₀ activa la expresión del gene de defensa *PAD3* y la acumulación de la fitoalexina camalexina en plántulas jóvenes y en plantas adultas de *A. thaliana* (capítulo 1). El incremento en la expresión de *PAD3* 24 h después del tratamiento con OG₁₀, estuvo acompañado por la acumulación de camalexina. Interesantemente, Ferrari y colaboradores (2007), señalan que 3 h después del tratamiento con OGAs se incrementan los niveles del transcrito de *PAD3*, pero no se indujo la acumulación de la fitoalexina. La discrepancia en cuanto a los tiempos de inducción de la expresión de este gene podría deberse a los diferentes tipos de sistemas experimentales utilizados (nosotros usamos plántulas desarrolladas en cajas Petri con medio sólido, mientras que Ferrari y colaboradores utilizan medio líquido con agitación) y/o al tipo de elicitor ensayado y su concentración. En lo que no tenemos explicación es porque no observan una correlación positiva en la expresión de *PAD3* y la acumulación de la fitoalexina. Sin embargo, los resultados mostrados en este trabajo son consistentes con lo reportado para otras especies vegetales, en los que un estímulo de defensa activa la expresión de genes de defensa e induce la acumulación de fitoalexinas (Ridley *et al.* 2001, Hernández *et al.* 2006) y en *A. thaliana* (Tsuji *et al.* 1992, Glazebrook and Ausubel 1994,

Zhou *et al.* 1999, Thomma *et al.* 1999, Kliebenstein 2004, Thatcher *et al.* 2005, García *et al.* 2006). Esta acumulación de camalexina sugiere que la planta percibe a OGA₁₀, el cual activa así cascadas de señalización que culminan con la expresión de genes relacionados con la defensa vegetal (Ridley *et al.* 2001). La señal de amplificación entre la percepción de OGA₁₀ y la expresión de genes de defensa, podría ser a través del ión Ca²⁺ actuando como segundo mensajero. Esta propuesta se apoya en datos reportados por Navazio (2002), (2008) y Lecourieux (2006), en donde se señala que los OGAs inducen la movilización del ión Ca²⁺ de compartimentos intracelulares estimulando una rápida y transitoria elevación de Ca²⁺ libre citosólico, promoviendo a su vez un amplio rango de respuestas celulares. Por otra parte, con relación a la síntesis de camalexina, Mattei (2005) y Denoux (2008) señalan que la cascada MAPK MPK3/MPK6, participa en la señalización de la defensa inducida por OGAs; En apoyo a dicha propuesta, recientemente se ha reportado la activación de la cascada de señalización MAPKKK α /MEKK1-MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 para la biosíntesis de camalexina por el hongo *B. cinerea* en *A. thaliana* (Ren *et al.* 2008).

Actualmente, la señalización por OGAs ha comenzado a ser más clara (Ferrari *et al.* 2007, Denoux *et al.* 2008). Algunos reportes señalan que parte de la respuesta transcripcional a los OGAs sucede de forma independiente de las rutas de señalización del ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno (Et) (Ferrari *et al.* 2007). Los resultados reportados recientemente por Denoux y colaboradores indican que en la respuesta transcripcional temprana a los OGAs (1 hr) se activa un circuito de señalización que involucra a SA, JA y Et; en tanto que las respuestas tardías no están relacionadas con dichas rutas de señalización (Denoux *et al.* 2008). Recientemente, el análisis proteómico diferencial (2-D DIGE) en *Arabidopsis* ha permitido identificar algunas proteínas asociadas a la pared celular involucradas en la respuesta a OGAs, entre estas, LRR y receptor-like cinasa han sido señaladas como proteínas candidatas de reconocimiento a OGAs (Casasoli *et al.* 2008).

Una vez que determinamos que *A. thaliana* percibe la presencia de OG₁₀ como un estímulo de defensa, caracterizamos las bases fisiológicas y genéticas a través de las cuales OG₁₀ regularía la arquitectura de la raíz. Este órgano percibe y responde a un amplio rango de estímulos ambientales (Porterfield 2002) y hormonales (Aloni *et al.* 2006), traduciéndolos en respuestas apropiadas que facilitan su funcionalidad a través del desarrollo de la raíz primaria y de las raíces secundarias. Es evidente de los resultados mostrados en este trabajo que OGA₁₀ promueve cambios en la arquitectura del sistema radicular de *A.*

thaliana, limitando el crecimiento de la raíz principal y estimulando el desarrollo de raíces laterales y de pelos radiculares (Capítulo 1). El análisis de la actividad mitótica en el meristemo radicular de *A. thaliana* reveló que el estimulador no alteraba el proceso de división celular en ninguna de las concentraciones ensayadas. En tanto que, inducían un efecto inhibitorio en la elongación de células de epidermis en plántulas silvestres. Apoyando estos resultados, encontramos que la zona de elongación de la raíz primaria en plántulas *CycB1::uidA* disminuye en presencia del estimulador. De esta forma se estableció que el efecto inhibitorio de OGA₁₀ en el crecimiento de la raíz primaria es causado por una limitada elongación celular de las células meristemáticas. Nuestros resultados nos permitieron establecer que OGA₁₀ puede actuar no solo como una señal de defensa sino también como una señal capaz de alterar el desarrollo de la raíz actuando a través de un mecanismo que limita la elongación celular.

En relación a este último hallazgo, concuerda con reportes previos donde muestran que los OGAs inducen modificaciones en la estructura y composición de la pared celular en plantas de tabaco y de *A. thaliana* (Bradley *et al.* 1992, Capodicasa *et al.* 2004). Una posible explicación a este comportamiento sería lo siguiente: una célula se elonga por el aflojamiento de la pared celular bajo la acción de diversas enzimas (ej. expansinas), las cuales son activadas por un ambiente ácido generado por el flujo de H⁺ hacia la matriz extracelular (respuesta a diferentes estímulos biológicos como luz y presencia de auxina). La acción de estas enzimas facilita el rompimiento de los enlaces no covalentes entre la celulosa y la red de polisacáridos de la pared, permitiendo así la incorporación de nuevo material de pared y el alargamiento celular (Rayle and Cleland 1992, Humphrey *et al.* 2007). Además, se ha reportado que los procesos de crecimiento y desarrollo vegetal, están regulados por la formación de gradientes de concentración de auxina en células y tejidos de la planta (Sabatini *et al.* 1999), lo que sugiere que la elongación celular también depende del establecimiento de dichos gradientes los cuales se establecen por un proceso dependiente del PAT (Michniewicz *et al.* 2007). La auxina es un potente regulador del desarrollo vegetal (Delker *et al.* 2008), y es sintetizada mayoritariamente en hojas jóvenes del sistema aéreo de la planta y transportada hacia la raíz por el sistema vascular. La formación y mantenimiento de gradientes de concentración de auxina, ocurre a través de un sistema específico de transporte de la hormona el cual requiere de un influjo y eflujo activo de auxina (Michniewicz *et al.* 2007). Por lo antes mencionado, consideramos la posibilidad de que la regulación del PAT podría jugar un papel relevante en las respuestas de desarrollo del sistema radicular de *A. thaliana* a OGA₁₀.

Para ello, evaluamos cambios en la concentración interna de auxinas monitoreados por la expresión del reportero de respuesta a auxinas *DR5::uidA*. OGA₁₀ no incrementa la expresión del marcador de respuesta a auxinas *DR5::uidA* en los meristemos de raíces primarias como lo hace la auxina ANA, indicando que la inhibición del crecimiento de la raíz por OGA₁₀ no se debe a un incremento de auxina en este tejido. Sin embargo, contrario a esto se observó un aumento en la expresión del marcador en los meristemos de las raíces laterales por OGA₁₀ (Capítulo 1). Aparentemente existe una regulación diferencial de la concentración interna de auxinas en la raíz por OGA₁₀, posiblemente por alteraciones en la distribución de la hormona en este tejido o bien, por una alteración de la respuesta a auxinas. En relación a lo último, se ha reportado que los OGAs suprimen diversas respuestas reguladas por auxinas en plantas de tabaco (Bellincampi *et al.* 1993, 1996, Mauro *et al.* 2002). Sin embargo, en ninguno de estos trabajos se ha descrito el mecanismo por el cual se suprimen dichas respuestas; únicamente se ha reportado que la sensibilidad a auxinas se reduce en *A. thaliana* por el tratamiento con una mezcla de OGAs. Aparentemente, dicha disminución es independiente de la degradación de auxina, debido a la ausencia de actividad de la AIA oxidasa en su sistema de estudio (Ferrari *et al.* 2008).

Continuando con el análisis del papel del PAT en los cambios en la arquitectura de la raíz inducidos por OGA₁₀, al bloquear el PAT en plantas Col-O con NPA y TIBA, fármacos que inhiben el transporte de auxinas (Capítulo 1 y 3) condujo a un hallazgo interesante, la respuesta de la raíz de las plantas a NPA fue similar a la inducida por OGA₁₀ (Capítulo 1), en términos de la disminución del crecimiento de la raíz primaria y de la expresión del marcador *DR5::uidA*. Sin embargo, por las diferencias en cuanto a las respuestas inducidas en el desarrollo de raíces laterales, sugerimos que NPA y OGA₁₀ inhiben el flujo de auxinas por un mecanismo distinto, pero comparten algunos elementos de regulación.

Los resultados del análisis de la respuesta de las mutantes del transporte de influjo y eflujo de auxina a OGA₁₀ (Capítulo 1), sugieren que dichos elementos de regulación del PAT por OGA₁₀ podrían ser las proteínas transportadoras de eflujo de auxina. Interesantemente, el inhibidor NPA ejerce su efecto por su capacidad de unión a proteínas (NBP) que forman parte del complejo proteico de la maquinaria de eflujo de auxina (Michniewicz *et al.* 2007). Recientemente, un análisis bioquímico en extractos proteicos de *A. thaliana*, permitió identificar a las proteínas NBP como miembros de las proteínas de resistencia a múltidrogas (MDR-PGP) de la familia de transportadores (ABC) de unión a ATP (PGP1 y

PGP19), las cuales se unen al NPA con diferentes afinidades (Geisler et al., 2005). La fosforilación y defosforilación de proteínas son modificaciones post-traduccionales comúnmente usadas en la regulación de la actividad y/o de la función de una proteína particular. La serina-treonina cinasa PINOID, promueve la localización polar de PIN1 por ello, la mutante *pinoid* exhibe un fenotipo similar al de *pin1* (Christensen et al. 2000). Asimismo, las proteínas PIN pueden ser reguladas por defosforilaciones catalizadas por la serina-treonina proteína fosfatasa 2A (PP2A) (Michniewicz et al. 2007). La subunidad reguladora de la PP2A es codificada por el gene ROOT CURLING IN NPA1 (RCN1) y la mutante *rcn1* exhibe una disminución en la actividad PP2A, defectos en la elongación de la raíz y el hipocotilo y alteraciones en la formación del gancho apical (Garbers et al. 1996), lo que sugiere que la PP2A puede desempeñar un papel en el transporte acropetalo de auxina en la raíz, el cuál es sensible a NPA (DeLong et al. 2002).

Interesantemente, se ha reportado que la actividad de las proteínas PGP1, PGP4 y PGP19 que regulan el eflujo de auxina son blancos directos de regulación por flavonoides, principalmente quercetina (Geisler et al. 2005, Bouchard et al. 2006, Blakeslee et al. 2007, Santelia et al. 2008). Los flavonoides se localizan en los tejidos que transportan auxina, lo que es consistente con su papel como moduladores de dicho transporte (Buer and Muday 2004, Peer and Murphy 2007). Un hallazgo interesante en este trabajo es que el tratamiento con 10^{-8} M de OGA₁₀ (concentración inhibitoria del crecimiento de la raíz principal y que también altera la distribución de auxina), ejerce un fuerte impacto sobre la ruta de biosíntesis de flavonoides (Capítulo 1). Además, el análisis de plántulas con un transporte elevado de auxina, *transparent testa (tt4-1*, mutante de *CHS*) fue consistente con su incapacidad para sintetizar flavonoides, por lo que no mostraron cambios significativos en la arquitectura del sistema radicular a OGA₁₀ al compararlo con la respuesta de las plantas silvestres. Estos resultados nos permitieron sugerir que dichos flavonoides son intermediarios importantes en la acción moduladora del PAT por OGA₁₀.

Asimismo, se ha propuesto que los flavonoides pueden regular de forma opuesta la expresión de PIN1 y PIN2, es decir, en ausencia de flavonoides la expresión de PIN2 se incrementa, en tanto que la de PIN1 se reprime; Asimismo, bajo dichas condiciones, PIN1 es des-localizada de la membrana plasmática, en tanto que PIN2 no. Lo anterior sugiere que los flavonoides regulan positivamente a PIN1 y negativamente a PIN2 (Peer et al. 2004). Asimismo, se ha comprobado que las auxinas inhiben la expresión de PIN1 en la raíz de Arabidopsis. (Peer et al. 2004, Peer y Murphy 2007).

Es evidente que los mecanismos de regulación del PAT son complejos y no sorprende que ambos transportadores (PGPs y PINs) compartan componentes de regulación. Es importante considerar la posible regulación inversa del PAT por los flavonoides como el resultado de la combinación de ambas regulaciones, la regulación de la actividad de las proteínas PGPs y la regulación de la actividad de las proteínas PINs, que puede ser dependiente de la concentración de flavonoides e interconectada (Santelia *et al.* 2008).

Dichos transportadores se expresan durante la embriogénesis, organogénesis y durante los tropismos, actuando tanto en forma sinérgica como antagónica, con el único propósito de regular el desarrollo vegetal que es dependiente de la distribución de auxina. Recientemente Mravec y colaboradores (2008) propusieron un modelo en el cuál, el eflujo celular de auxina mediado por las PGPs controla los niveles de auxina y de esta forma garantiza la disponibilidad de la hormona para el movimiento vectorial de auxina dependiente de PIN (Mravec *et al.* 2008).

Con base en los análisis realizados en este trabajo, podemos concluir que OGA₁₀ es una molécula compleja capaz de inducir respuestas de defensa y al mismo tiempo, inducir respuestas morfológicas en la raíz de *A. thaliana*, a través de un mecanismo de acción que involucra la síntesis y acumulación de flavonoides; estos últimos actuarían como moduladores negativos del PAT inhibiendo el eflujo de auxinas en las células, lo que finalmente conduce a los cambios en la arquitectura de la raíz. (Fig. 10).

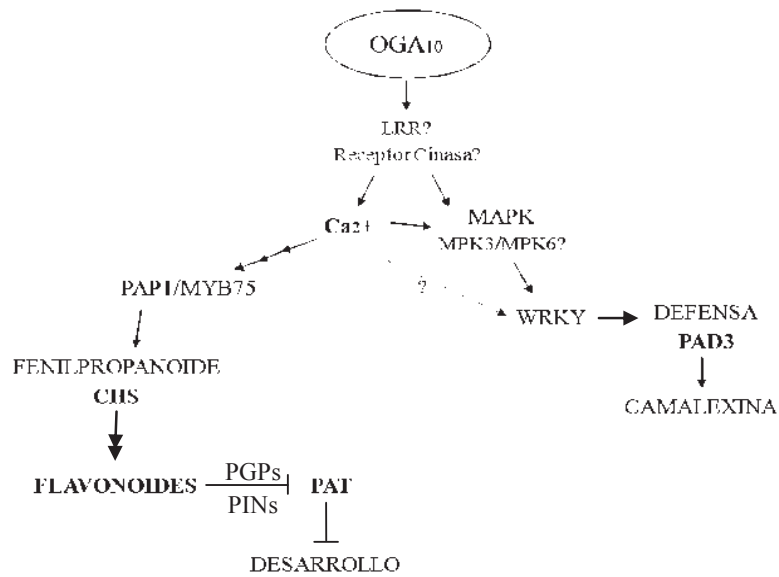


Figura 11. Modelo hipotético de acción de OGA₁₀. El estimulador de defensas OGA₁₀ es reconocido por un posible receptor de membrana (LRR y/o receptor cinasa), activando cascadas de señalización (Ca²⁺, MAPK) que inducen la síntesis de factores de transcripción (WRKY) para la activación de genes de defensa (*PAD3*) que codifican para enzimas en la ruta de biosíntesis de compuestos antimicrobianos (camalexina). Este mismo estímulo activa la ruta fenilpropanoide para la síntesis de flavonoides que pueden modular el transporte polar de auxina por la inactivación de proteínas transportadoras de eflujo de auxina (PGPs, PINs), de forma tal que modifica la arquitectura de la raíz en *A. thaliana*.

VIII. PERSPECTIVAS Y/O RECOMENDACIONES

El estudio de los mecanismos moleculares que regulan los cambios de la arquitectura del sistema radicular en respuesta a la activación de la defensa por OGA₁₀ utilizando como modelo de estudio a *Arabidopsis thaliana*, ha permitido identificar algunos componentes de esta maquinaria, sin embargo, el avance en el estudio de este mecanismo sería de gran utilidad para el entendimiento sobre la biología de la interacción planta-patógeno y su relación con el desarrollo de la planta.

Sin lugar a dudas, el desarrollo de este trabajo respondió algunas preguntas fundamentales, sin embargo, surgieron algunas otras de gran interés como son:

1. Evaluar el papel de la sensibilidad y síntesis de auxinas en los cambios en la arquitectura de la raíz inducidos por OGA₁₀.

Los resultados de nuestro trabajo sugieren que el OGA altera el PAT a través de la síntesis de flavonoides. Sabemos que la respuesta a auxina puede darse por otros factores tales como la sensibilidad y síntesis de la hormona. Para descartar que estos últimos factores pudieran estar involucrados en el efecto del OGA₁₀, planteamos los siguientes experimentos:

Para determinar la respuesta a OGA a nivel de sensibilidad evaluaríamos la respuesta de plántulas mutantes de *Arabidopsis tir1*. El producto del gen TIR1 (TRANSPORTER INHIBITOR RESPONSE 1) requerido para la respuesta a auxina. TIR se ha definido como el receptor de auxina y su acción está implicada en procesos mediados por ubiquitina.

Para determinar si el encendido de la defensa por OGA₁₀ altera la síntesis de auxinas en *Arabidopsis* analizaríamos la respuesta de la doble mutante *cyp79B2 cyp79B3* y/o de la mutante *tir7-1* al tratamiento con OGA₁₀. Los productos de los genes CYP79 participan en la ruta de biosíntesis de AIA-dependiente de triptofano en la raíz de *Arabidopsis*. La mutante *tir7-1* carece del gen ASA1 que codifica para la enzima antranilato sintasa y que participa en la ruta de biosíntesis de AIA-dependiente e independiente de triptofano en la parte aérea principalmente y en la raíz de *Arabidopsis*. Otra estrategia sería analizar la expresión de marcadores que indican cambios en la concentración interna de auxinas, como son las líneas transgénicas CYP79B2::GUS y CYP79B3::GUS.

2. Evaluar la regulación de la actividad de los transportadores de auxina por OGA₁₀.

Los flavonoides actúan sobre las proteínas transportadoras de auxina, PGP por un mecanismo que interrumpe la interacción PGP-TWD1. Sin embargo no se conoce como se modula esta acción. OGA₁₀ podría regular la actividad transportadora de las proteínas

PGPs y/o PIN a través PIN a través de la regulación de la actividad de proteínas CINASAS reguladoras como son la RCN1 y PID (PINOID), las cuales median la fosforilación y la polaridad de las proteínas transportadoras. Para esclarecer este punto, se evaluaría la participación de las cinasas antes mencionadas, determinando la respuesta a OGA₁₀ en las mutantes *rcn1* y *pid*.

3. Esclarecer cuál es el transporte de auxina regulado por OGA₁₀.

Para abordar lo anterior, se evaluaría la respuesta de las mutantes *mdr1* afectadas en el transporte acropetal de auxina, así como también de las mutantes *mdr4* afectadas en el transporte basipetal de auxina en la raíz de *Arabidopsis*. El gene MDR1 se expresa en la estela o cilindro vascular en donde regula el transporte de la parte aérea de la planta hacia la punta de la raíz (transporte acropetal de auxina), y su proteína se localiza en la zona de diferenciación celular. El gene MDR4 es responsable de mediar el flujo desde la punta de la raíz hacia la zona de elongación (transporte basipetal de auxina).

4. Analizar el papel de genes de respuesta a auxina involucrados en los cambios de la arquitectura de la raíz en respuesta a OGA₁₀.

Para evaluar lo anterior, se seleccionarían genes de respuesta a auxina que se expresan en la raíz y cuya función está relacionada con el desarrollo de la raíz. El análisis de dichos genes se llevaría a cabo a través del análisis de sus transcritos por RT-PCR cuantitativo.

5. Evaluar la participación de la señalización MAPK (MPK3/MPK6) en la traducción de la señal de OGA₁₀.

Para abordar lo anterior, se evaluaría la respuesta de las mutantes *mpk3* y *mpk6* (Proteínas cinasas comprendidas en la cascada de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitogenos) a OGA₁₀. Adicionalmente a este estudio, se medirá la actividad cinasa por un procedimiento basado en la fosforilación de la proteína básica de mielina y como donador del grupo fosforilo se utilizará el ATP. Este análisis se realizaría bajo el protocolo del sistema no radioactivo MAP Kinase Assay Kit (Upstate biotechnology).

6. Analizar la regulación transcripcional de factores de transcripción que participan en el encendido de las rutas síntesis de flavonoides y camalexina.

En relación a la ruta de síntesis de flavonoides, se evaluaría la respuesta de la triple mutante *myb11myb12myb111* a OGA₁₀, la cual, genéticamente carece del subgrupo

completo de genes R2R3-MYB (Factores de transcripción que regulan la acumulación de flavonoides en diferentes partes de la planta de *Arabidopsis*), y por consiguiente no sintetizan flavonoides. Para la ruta de síntesis de camalexina se evaluaría la respuesta de mutantes *wrky* a OGA₁₀.

7. Establecer cuáles son las bases genéticas y fisiológicas de la regulación del desarrollo post-embionario de la parte aérea de la planta por OGA₁₀ y su relación con la síntesis, transporte y percepción de auxina.

Básicamente se implementaría un análisis detallado de los cambios fisiológicos y celulares de la parte aérea de plántulas de *Arabidopsis* y se llevaría a cabo un análisis de líneas mutantes y líneas transgénicas siguiendo una estrategia similar a la usada para el análisis de la raíz.

X. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

Abel, S., Nguyen, M.D. y A. Theologis. 1995. **The PS-IAA4/5-like family of early auxin-inducible mRNAs in *Arabidopsis thaliana*.** *J. Mol. Biol.* 251: 533-49.

Abel, S. y A. Theologis. 1996. **Early genes and auxin action.** *Plant Physiol.* 111: 9-17.

Abramovitch, R.B., Anderson, J.C. y Martin, G.B. 2006. **Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 601-611.

Agrios G.N. 2005. **Plant Pathology 5th edition.** Elsevier Academic Press (Ed). 84 Theobald's road, London, UK.

Altamura, M.M., Zaghi D., Salvi G., De Lorenzo G. y D. Bellincampi. 1998. **Oligogalacturonides stimulate pericycle cell wall thickening and cell divisions leading to stoma formation in tobacco leaf explants.** *Planta* 204:429-436.

Ambudkar, S., Dey, S., Hrycyna, C., Ramachandra, M., Pastan, I. y M. Gottesman. 1999. **Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter.** *Annu Rev Pharmacol* 39: 361-398.

Aziz, A., Gauthier, A., Bezier, A., Poinssot, B., Joubert, J.M., Pugin, A., Heyraud, A. y Baillieul, F. 2007. **Elicitor and resistance-inducing activities of β -1,4 cellodextrins in grapevine, comparison with β -1,3 glucans and α -1,4 oligogalacturonides.** *J Exp Bot* 58:1463-1472.

Aziz, A., Heyraud, A. y Lambert, B. 2004. **Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*.** *Planta* 218: 767-774.

Bailly, A., Sovero, V., Vincenzetti, V., Santelia, D., Bartnik, D., Koenig, B.W., Mancuso, S., Martinoia, E. y M. Geisler. 2008. **Modulation of P-glycoproteins by auxin transport inhibitors is mediated by interaction with immunophilins.** *Journal of Biological Chemistry* 283: 21817-21826.

Bandyopadhyay, A., Blakeslee, J.J., Lee, O.R., et al. 2007. **Interactions of PIN and PGP auxin transport mechanisms.** *Biochemical Society Transactions* 35: 137-141.

Benjamins, R., Malenica, N. y C. Luschnig. 2005. **Regulating the regulator: the control of auxin transport.** *Bioessays* 27: 1246-1255.

Benjamins, R., Quint, A., Weijers, D., Hooykaas, P. y R. Offringa. 2001. **The PINOID protein kinase regulates organ development in Arabidopsis by enhancing polar auxin transport.** *Development* 128: 4057-4067.

Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová, D., Jürgens, G. y J. Friml. 2003. **Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation.** *Cell* 115: 591-602.

Bent, A.F., y Mackey, D. 2007. **Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions.** *Annu. Rev. Phytopathol.* 45: 399-436.

Blakeslee, J.J., Bandyopadhyay, A., Lee, O.R., et al. 2007. **Interactions among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in Arabidopsis.** *The Plant Cell* 19: 131-147.

Boller T. 1995. **Chemoperception of microbial signals in plant cells.** *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46:189-214.

Boller, T. y Felix, G. 2009. A Renaissance of Elicitors: **Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors.** *Annu. Rev. Plant Biol.* 60: 379-406.

Boysen-Jensen P. 1913. **Über die Leitung des phototropischen Reizes in der Avenakoleoptile.** *Berichte des Deutschen Botanischen Gesellschaft* 31:559-566.

Carpita, N. y M. McCann. 2000. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants.** *American Society of Plant Physiologists.* Rockville, Meriland, USA.

Casasoli, M., Spadoni, S., Lilley, K.S., Cervone, F., De Lorenzo, G. y B. Mattei. 2008. **Identification by 2-D DIGE of apoplastic proteins regulated by Oligogalacturonides in *Arabidopsis thaliana*.** *Proteomics* 8: 1042-1054.

Chisholm, S.T. Coaker, G.B. y B.J. Staskawicz. 2006. **Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response.** *Cell* 124: 803-814.

Cho, M., Lee, S.H. y H.T. Cho. 2007. **P-glycoprotein4 displays auxin efflux transporter-like action in *Arabidopsis* root hair cells and tobacco cells.** *The Plant Cell* 19: 3930-3943.

Christensen, S.K., Dagenais, N., Chory, J. y D. Weigel. 2000. **Regulation of auxin response by the protein kinase PINOID.** *Cell* 100: 469-478.

Côte, F. y MG. Hahn. 1994. **Oligosaccharins: structures and signal transduction.** *Plant Mol. Biol.* 26: 1379-1411.

Darvill, A.G. y Albersheim, P. 1984. **Phytoalexins and their elicitors—a defense against microbial infection in plants.** *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 35:243-275.

Davies P.J. 2004. **Plant Hormones: biosynthesis, signal transduction, action!** *Kluwer Academic Publishers.* Dordrecht, The Netherlands.

Ebel, J. y D. Scheel. 1997. **Signals in host-parasite interactions.** "*The Mycota V Part A*". Carroll/Tudzynski Ed. Springer-Verlag.

Eberhard, S., Doubrava N., Marfà V., Mohnen D., Southwick A., Darvill A. y P. Albersheim. 1989. **Pectic cell wall fragments regulate tobacco thin-cell-layer explant morphogenesis.** *Plant Cell* 1:747-755.

Eckardt N.A. 2001. **Auxin and the power of the proteasome in plants.** *Plant Cell.* 13: 2161-2163.

Flor H.H. 1971. **Current status of the gene-for-gene concept.** *Annu. Rev. Phytopathol.* 9: 275-296.

Francis, D., Dudits D. y D. Inzé. 1998. **Plant Cell Division.** *Portland Press Ltd.*, London. pp. 347.

Friml, J. 2003. **Auxin transport - shaping the plant.** *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 7-12.

Friml, J. y K. Palme. 2002. **Polar auxin transport—old questions and new concepts?** *Plant Mol. Biol.* 49: 273-284.

Friml, J., Benková, E., Blilou, I., Wisniewska, J., Hamann, T., Ljung, K., Woody, S., Sandberg, G., Scheres, B., Jürgens, G. y K. Palme. 2002a. **AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in Arabidopsis.** *Cell* 108: 661-673.

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

Friml, J., Yang X., Michniewicz M., Weijers D., Quint A., Tietz O., Benjamins R., Ouwerkerk P. B., Ljung K., Sandberg G., Hooykaas P. J., Palme K. y R. Offringa. 2004. **A PINOID-dependent binary switch in apical basal PIN polar targeting directs auxin efflux.** *Science* 306: 862-865.

Gälweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A. y K. Palme. 1998. **Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue.** *Science* 282: 2226-2230.

García, A.V. y Parker, J. 2009. **Heaven's Gate: nuclear accessibility and activities of plant immune regulators.** *Trends in Plant Science* (14) 9: 479-487.

Geisler, M. y A.S. Murphy. 2006. **The ABC of auxin transport: The role of p-glycoproteins in plant development.** *FEBS Lett* 580(4): 1094-1102.

Geisler, M., Blakeslee, J.J., Bouchard, R., Lee, O.R., Vincenzetti, V., Bandyopadhyay, A., Titapiwatanakun, B., Peer, W.A., Bailly, A., Richards E.L., Ejendal, K.F., Smith, A.P., Baroux, C., Grossniklaus, U., Müller, A., Hrycyna, C.A., Dudler, R., Murphy, A.S. y E. Martinoia. 2005. **Cellular efflux of auxin catalyzed by the Arabidopsis MDR/PGP transporter AtPGP1.** *Plant J.* 44: 179-194.

Glazebrook J. 2005. **Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens.** *Annual Review of Phytopathology* 43: 205-227.

Glawischnig E. 2007. **Camalexin.** *Phytochem.* 68: 401-406.

Greenberg J.T. 1997. **Programmed Cell Death In Plant-Pathogen Interactions.** *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 525-545.

Guilfoyle, T., Hagen, G., Ulmasov, T. y J. Murfett. 1998. **How does auxin turn on genes?.** *Plant Physiol.* 118: 341-347.

Gust, A.A., Biswas, R., Lenz, H.D., Rauhut, T., Ranf, S., Kemmerling, B., Götz, F., Glawischnig, E., Lee, J., Felix, G. y Nürnberger, T. 2007. **Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in Arabidopsis.** *J. Biol. Chem.* 282: 32338-32348.

Hahn M.G. 1996. **Microbial elicitors and their receptors in plants.** *Ann. Rev. Phytopathol* 34: 387-412.

Hématy, K., Cherk, C. y Somerville Sh. 2009. **Host-pathogen warfare at the plant cell wall.** *Curr. Opin. Plant Biol.* 12:406-413.

Hückelhoven R. 2007. **Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility.** *Annu Rev Phytopathol.* 45: 101-127.

Humphrey, T.V., Bonetta, D.T. y Goring D.R. 2007. **Sentinels at the wall: cell wall receptors and sensors.** *New Phytol.* 176: 7-21.

Jacobs, M. y P.H. Rubery. 1988. **Naturally occurring auxin transport regulators.** *Science* 241: 346-349.

Jones, J.D.G. y Dangel, J.L. 2006. **The plant immune system.** *Nature* 444:323-329.

Joo, J.H., Bae, Y.S. y J.S. Lee. 2001. **Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism.** *Plant Physiol* 126: 1055-1060.

Lewis, D.R., Miller, N.D., Splitt, B.L., Wu, G. y E.P. Spalding. 2007. **Separating the roles of acropetal and basipetal auxin transport on gravitropism with mutations in two Arabidopsis multidrug resistance-like ABC transporter genes.** *The Plant Cell* 19: 1838-1850.

Leyser O. 2006. **Dynamic integration of auxin transport and signalling.** *Curr. Biol.* 16: 424-33.

Leyser, H.M., Pickett, F.B., Dharmasiri, S. y M. Estelle. 1996. **Mutations in the AXR3 gene of Arabidopsis result in altered auxin response including ectopic expression from the SAUR-AC1 promoter.** *Plant J.* 10: 403-413.

Ljung, K., Bhalerao, R.P. y G. Sandberg. 2001. **Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth.** *Plant J.* 28: 465-74.

Ljung, K., Hull, A.K., Celenza, J., Yamada, M., Estelle, M., Normanly, J. y G. Sandberg. 2005. **Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots.** *Plant Cell* 17: 1090-1104.

Ljung, K., Hull, A.K., Kowalczyk, M., Marchant, A., Celenza, J., Cohen, J.D. y Sandberg. 2002. **Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in Arabidopsis thaliana.** *Plant Mol. Biol.* 50: 309-332.

Lomax, T.L., Muday, G.K. y P.H. Rubery. 1995. **Auxin transport.** En: Davies, P.J. (Ed). **Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology.** Kluwer, Dordrecht, Netherlands.

Marchant, A., et al., 2002. **AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the Arabidopsis seedling.** *Plant Cell* 14: 589-597.

Martinoia, E., Klein, M., Geisler, M., Bovet., L., Forestier, C., Kolukisaoglu, U., Muller-Rober, B. y B. Schultz. 2002. **Multifunctionality of plant ABC transporters - more than just detoxifiers.** *Planta* 214: 345-355.

Mathesius, U., Schlaman, H.R.M., Spaink, H.P., Sautter, C., Rolfe, B.G. y M.A. Djordjevic. 1998. **Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides.** *Plant J* 14: 23-34.

Michniewicz, M., Brewer, P.B. y J. Friml. 2007. **Polar Auxin Transport and Asymmetric Auxin Distribution.** *The Arabidopsis Book*. doi:10.1199/tab.0108.

Mockaitis, K. y M. Estelle 2008. **Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm.** *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24: 55-80.

Montesano, M., Brader, G. y Tapio, E.P. 2003. **Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants.** *Molecular Plant Pathology* 4 (1): 73-79.

Moscatiello, R., Mariani, P., Sanders, D. y Maathuis, F.J. 2006. **Transcriptional analysis of calcium-dependent and calcium-independent signalling pathways induced by oligogalacturonides.** *J Exp Bot.* 57: 2847-2865.

Muday, G.K. y A. DeLong. 2001. **Polar auxin transport: controlling where and how much.** *Trends Plant Sci.* 6: 535-542.

Muday, G.K. y A.S. Murphy. 2002. **An emerging model of auxin transport regulation.** *Plant Cell* 14: 293-299.

Mur, L.A., Kenton, P., Lloyd, A.J., Ougham, H., y Prats, E. 2008. **The hypersensitive response: the centenary is upon us but how much do we know?** *J. Exp. Bot.* 59: 501-520.

Murphy, A.S., Hoogner, K.R., Peer, W.A. y L. Taiz. 2002. **Identification, purification, and molecular cloning of N-1-naphthylphthalamic acid-binding plasma membrane-associated aminopeptidases from *Arabidopsis***. *Plant Physiol.* 128:935-950.

Noh, B., Bandyopadhyay, A., Peer, W.A., Spalding, E.P. y A.S.Murphy. 2003. **Enhanced gravi- and phototropism in plant *mdr* mutants mislocalizing the auxin efflux protein PIN1**. *Nature* 423: 999-1002.

Noh, B., Murphy, A.S. y E.P. Spalding. 2001. **Multidrug resistance-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin mediated development**. *Plant Cell* 13: 2441-2454.

Nürnbergger, T., Brunner, F., Kemmerling, B. y L. Piater. 2004. **Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences**. *Immunol. Rev.* 198: 249-266.

Nürnbergger, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W. R., Halhbrock, K. y D. Scheel. 1994. **High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses**. *Cell* 78: 449-460.

Osorio, S., Castillejo, C., Quesada, M.A., Medina-Escobar, N., Brownsey, G.J., Suau, R., Heredia, A., Botella, M.A. y Valpuesta, V. 2008. **Partial demethylation of oligogalacturonides by pectin methyl esterase 1 is required for eliciting defence responses in wild strawberry (*Fragaria vesca*)**. *Plant J.* 54: 43-55.

Paponov, I.A., Teale, W.D., Trebar, M., Blilou, I. y K. Palme. 2005. **The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives**. *Trends Plant Sci.* 10: 170-177.

Peer, W.A., Brown, D.E., Tague, B.W., Muday, G.K., Taiz, L. y A.S. Murphy. 2001. **Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of *Arabidopsis***. *Plant Physiol* 126: 536-548.

Petersson, S.V., et al., 2009. **An auxin gradient and maximum in the Arabidopsis root apex shown by high-resolution cell-specific analysis of AIA distribution and synthesis.** *Plant Cell* 21: 1659-1668.

Petrášek, J., Wiśniewska, J., Seifertová, D., Bouchard, R., Blakeslee, J.J., Xu, J., Abas, L., Tadele, Z., Perry, L., Mravec, J., Brewer, P., Čovanová, M., Růžička, K., Skůpa, P., Blilou, I., Lee, O.R., Benková, E., Kuhlemeier, C., Geisler, M., Murphy, A.S., Scheres, B., Luschnig, C., Zažímalová, E. y Friml, J. 2006. **PIN proteins are auxin efflux catalysts determining both quantity and direction of auxin flow in plants.** *Science* 312: 914-918.

Pieterse, C.M.J. y Dicke, M. 2007. **Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology.** *Trends Plant Sci.* 12: 564-569.

Pitzschke, A., Schikora, A. y Hirt, H. 2009. **MAPK cascade signalling networks in plant defence.** *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 421-426.

Rashotte, A.M., DeLong, A. y Muday, G.K. 2001. **Genetic and chemical reductions in protein phosphatase activity alter auxin transport, gravity response, and lateral root growth.** *The Plant Cell* 13: 1683-1697.

Rauhut, T., Luberacki, B., Seitz, H.U. y Glawischnig, E. 2009. **Inducible expression of a Nep1-like protein serves as a model trigger system of camalexin biosynthesis.** *Phytochem.* 70: 185-189.

Raven J.A. 1975. **Transport of indoleacetic acid in plant cells in relation to pH and electrical potential gradients and its significance for polar IAA transport.** *New Phytol.* 74: 163-172.

Raven, P.H., Evert, R.F. y Eichhorn, S.U. 1999. **Biology of Plants 6th Edition.** W.H. Freeman and Company. USA pp 944.

Rayle D.L. y R.E. Cleland. 1992. **The Acid Growth Theory of Auxin-induced Cell Elongation Is Alive and Well.** *Plant Physiol.* 99: 1271-1274.

Reinhardt, D., Pesce, E.R., Stieger, P., Mandel, T., Baltensperger, K., Bennett, M., Traas, J., Friml, J. y C. Kuhlemeier. 2003. **Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport.** *Nature* 426: 255-260.

Ren, D., Liu, Y., Yang, K.Y., Han, L., Mao, G., Glazebrook, J. y Zhang, S. 2008. **A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in Arabidopsis.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 5638-5643.

Rojo, E., Solano, R. y Sanchez-Serrano, J.J. 2003. **Interactions between signaling compounds involved in plant defense.** *Journal of Plant Growth Regulation* 22: 82-98.

Rubery P.H. y Shelldrake, A.R. 1974. **Carrier-mediated auxin transport.** *Planta* 188: 101-121.

Ruegger, M., Dewey, E., Hobbie, L., Brown, D., Bernasconi, P., Turner, J., Muday, G., y Estelle, M. 1997. *Plant Cell* 9(5): 745-757.

Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y. y Hunt, M.D. 1996. **Systemic acquired resistance.** *The Plant Cell* 8: 1809-1819.

Qiu, J.L., et al. 2008. **Arabidopsis MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus.** *EMBO J.* 27: 2214-2221.

Qutob, D., et al. 2006. **Phytotoxicity and innate immune responses induced by Nep1-like proteins.** *Plant Cell* 18: 3721-3744.

Santelia, D., Vincenzetti, V., Azzarello, E., Bovet, L., Fukao, Y., Duchtig, P., Mancuso, S., Martinoia, E. y Geisler, M. 2005. **MDR like ABC transporter AtPGP4 is involved in auxin-mediated lateral root and root hair development.** *FEBS Letters* 579: 5399-5406.

Scheres, B. y J. Xu. 2006. **Polar auxin transport and patterning: grow with the flow.** *Genes Dev.* 20: 922-926.

Schiefelbein, J. y P.N. Benfey. 1991. **The development of plant roots: New approaches to underground problems.** *Plant Cell* 3: 1147-1154.

Schopfer, P., Liskay, A., Bechtold, M., Frahry, G. y A.Wagner. 2002. **Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth.** *Planta* 214: 821-828.

Seilaniantz, A.R. Navarro, L. Bari, R. y Jones, J.D.G. 2007. **Pathological hormone imbalances.** *Curr. Opin. Plant Biol.* 10:372-379.

Shah J. 2009. **Plants under attack: systemic signals in defence.** *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 459-464.

Shibuya, N. y E. Minami. 2001. **Oligosaccharide signalling for defence responses in plants.** *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 59: 223-233.

Sidler, M., Hassa, P., Hasan, S., Ringli, C. y R. Dudler. 1998. **Involvement of an ABC transporter in a developmental pathway regulating hypocotyl cell elongation in the light.** *Plant Cell* 10: 1623-1636.

Sloley, B.D., Urichuk, L.J., Morley, P., Durkin, J., Shan, J.J., Pang, P.K.T. y R.T. Coutts. 2000. **Identification of kaempferol as a monoamine oxidase inhibitor and potential neuroprotectant in extracts of *Ginkgo biloba* leaves.** *J Pharm Pharmacol* 52: 451-459.

Somerville, Ch., Bauer, S. Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredez, A. Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S. y H. Youngs. 2004. **Toward a systems approach to understanding plant cell walls.** *Science* 306(5705): 2206-2211.

Taiz, L. y E. Zeiger. 2006a. **Auxin: The growth hormone.** En: **Plant Physiology.** *Sinauer Associates, Inc. Publishers* (4th Ed). Sunderland, Massachusetts, USA. pp 467-507.

Taiz, L. y E. Zeiger. 2006b. **Stress Physiology.** En: **Plant Physiology.** *Sinauer Associates, Inc. Publishers* (4th Ed). Sunderland, Massachusetts, USA. pp 671-703.

Tatematsu, K., Kumagai, S., Muto, H., Sato, A., Watahiki, M.K. *et al.* 2004. **MASSUGU2 encodes *Aux/IAA19*, an auxin-regulated protein that functions**

together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16: 379-393.

Taylor, L.P. y E. Grotewold. 2005. *Curr Opin Plant Biol* 8(3): 317-323.

Teale, W.D., Paponov I.A. y K. Palme. 2006. **Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 847-859.

Terasaka, K., Joshua J. Blakeslee, J.J., Titapiwatanakun, B., Peer, W.A., Bandyopadhyay, A., Makam, S.N., Lee, O.R., Richards, E.L., Murphy, A.S., Sato, F., Yazaki, K. 2005. **PGP4, an ATP-binding cassette P-glycoprotein, catalyzes auxin transport in *Arabidopsis thaliana* roots.** *Plant Cell*

Thaler, J.S. y R.M. Bostock. 2004. **Interactions between abscisic-acid-mediated responses and plant resistance to pathogens and insects.** *Ecology* 85: 48-58.

Tian, Q., Uhlir, N.J. y J.W. Reed. 2002. ***Arabidopsis* SHY2/IAA3 inhibits auxin-regulated gene expression.** *Plant Cell* 14: 301-319.

Tromas, A. y C. Perrot-Rechenmann 2010. **Recent progress in auxin biology.** *C.R. Biologies* 333: 297-306.

Van Breusegem, F., Bailey-Serres, J. y Mittler, R. 2008. **Unraveling the tapestry of networks involving reactive oxygen species in plants.** *Plant Physiol.* 147: 978-984.