



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

“Estudio de la interacción entre el ácido jasmónico y el óxido
nítrico en la regulación de la arquitectura de la raíz en
Arabidopsis thaliana”

Tesis que presenta

Q.F.B AMIRA GARNICA VERGARA

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en

Biología Experimental

Director de Tesis

D.C. José López Bucio

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección del D.C. José López Bucio.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Rosa María Vergara García y Rafael Garnica Gómez, por su apoyo incondicional, por su amor y esfuerzo en cada paso de mi vida.

A mi esposo, Novo, por tu hermosa compañía, por los ánimos, por enseñarme a luchar, por tu amor.

Al D.C. José López Bucio, por darme la oportunidad de formar parte de su grandioso equipo de trabajo, por ser un ejemplo digno de admirarse, por brindarme más allá de conocimientos con su experiencia y forma de afrontar cada reto y salir exitoso.

A la D.C. Elda Beltrán Peña, al D.C. Ernesto García Pineda, al D.C. Homero Reyes de la Cruz y al D.C. Eduardo Valencia Cantero, por tomarse el tiempo de formar parte de mi comité de evaluación y por contribuir con sus conocimientos para la revisión de este trabajo. Especialmente a la Dra. Elda por su amabilidad siempre que le solicité revisiones y trabajos.

Al D.C. Juan José Valdez Alarcón del CMEB de la UMSNH por su amabilidad para facilitarnos las instalaciones del microscopio confocal para la realización de este trabajo.

A mis compañeros y buenos amigos del laboratorio: Aarón, Alex, Edith, Hexon, Javier, León, Randy, Ramón, Quique, Lupis, Juan Bosco, Liz y Arnoldo por su amistad, los buenos momentos, por compartir sus conocimientos y brindarme ayuda. Especialmente a Javier por ser un excelente maestro y sobretodo buena persona conmigo y a León y Randy por su disponibilidad y ayuda para realizar los ensayos en el microscopio confocal.

A mis compañeros y amigos de la maestría: Nancy, Pao, Eliseo, Rafita, Mau, Omarcín y Ale por los ánimos y su amistad y en especial a dos grandes amigos que siempre me comprendieron y apoyaron, Deya y Chava.

Especialmente al D.C. Alfredo Saavedra Molina y a la Q.F.B. Mónica Clemente Guerrero por su amistad y por inspirarme en el camino de la ciencia y la felicidad.

A mis hermanos, Luis y Rafael, por apoyarme en cada etapa de mi vida y por quererme como yo los quiero.

A mi querido abuelito Antonio Garnica García, donde quiera que estés, sé que estas muy orgulloso de mí.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada durante la realización de este trabajo.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDO.	i
ÍNDICE DE FIGURAS.	iv
RESUMEN.	1
1. INTRODUCCIÓN.	3
2. ANTECEDENTES.	5
2.1. El modelo de estudio <i>Arabidopsis thaliana</i> .	5
2.2. La raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	5
2.3. Reguladores del crecimiento.	7
2.4. Los jasmonatos.	8
2.5. Síntesis de jasmonatos.	8
2.6. Metabolitos del ácido jasmónico (AJ).	11
2.7. Señalización de los jasmonatos.	11
2.8. Funciones de los jasmonatos.	14
2.8.1. Inmunidad vegetal.	14
2.8.2. Regulación del desarrollo.	15
2.9. El óxido nítrico (ON).	16
2.10. Síntesis de óxido nítrico.	16
2.11. Percepción y transducción de la señal del ON en plantas.	19
2.12. Interacción de los jasmonatos con el ON.	22
3. JUSTIFICACIÓN.	23
4. HIPÓTESIS.	23
5. OBJETIVOS.	24
5.1. Objetivo general.	24
5.2. Objetivos específicos.	24

6. MATERIALES Y MÉTODOS.	25
6.1. Material biológico.	25
6.2. Compuestos químicos.	25
6.3. Preparación de las semillas.	25
6.4. Condiciones de crecimiento.	26
6.5. Análisis de crecimiento.	26
6.6. Detección de óxido nítrico por microscopía confocal.	27
6.7. Análisis histoquímico.	27
6.8. Obtención de cruzas.	27
7. RESULTADOS.	29
7.1. El ácido jasmónico inhibe el crecimiento de la raíz primaria e induce la formación de raíces laterales de <i>A. thaliana</i> .	29
7.2. La mutante deficiente en ON, <i>Atnoa1</i> , mostró resistencia en la formación de raíces laterales inducida por AJ, mientras que la doble mutante <i>nia1 nia2</i> , se comporta de manera similar que el control.	30
7.3. La mutante resistente a alcaloides <i>drr1</i> , mostró resistencia en la formación de raíces laterales inducida por AJ.	32
7.4. La mutante <i>coronatine insensitive 1 (coi1-1)</i> , es insensible a los efectos del AJ en la regulación de la arquitectura de la raíz.	33
7.5. La mutante <i>coi1-1</i> no es resistente a los efectos del donador de ON, SNP, sobre el desarrollo de la raíz.	35
7.6. Las mutantes resistentes al AJ, <i>jar1-1</i> y <i>axr1-3</i> , no presentan resistencia a los efectos producidos por el SNP.	36
7.7. El SNP induce un aumento en los niveles de ON en tejidos de la raíz de <i>Arabidopsis</i> y promueve procesos de diferenciación.	37
7.8 El AJ induce un incremento en los niveles de ON endógeno lo que lleva a la activación de procesos de diferenciación.	39
7.9 La mutante asociada al ON, <i>Atnoa1</i> , es sensible al aumento en los niveles de ON en respuesta al AJ.	41

7.10. La mutante insensible <i>coi1-1</i> es resistente al incremento de los niveles de ON en respuesta al AJ.	42
7.11. El AJ y el SNP inducen la expresión del gen <i>LOX2</i> de respuesta temprana a AJ.	43
7.12. AtNOA1 y DRR1 regulan de manera positiva la expresión del gen <i>LOX2</i> inducible por AJ.	44
8. DISCUSIÓN.	46
9. CONCLUSIÓN.	53
10. LITERATURA CITADA.	54
11. APÉNDICE.	64

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Estructura del sistema radicular de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	6
Figura 2. Síntesis del ácido jasmónico.	10
Figura 3. Comparación estructural del jasmonoil-isoleucina y la coronatina.	12
Figura 4. El complejo SCF ^{COI1} es requerido para la señalización de jasmonatos.	13
Figura 5. Biosíntesis de ON en plantas.	17
Figura 6. Señalización del ON en la célula vegetal.	21
Figura 7. Efecto del AJ sobre la arquitectura radicular de <i>A. thaliana</i> .	30
Figura 8. Efecto del AJ sobre la arquitectura radicular de plantas deficientes en ON.	31
Figura 9. Efecto del AJ sobre la mutante resistente a alcaloides <i>drr1</i> .	33
Figura 10. Efecto del AJ sobre la mutante <i>coi1-1</i> .	34
Figura 11. Efecto del SNP sobre la mutante <i>coi1-1</i> .	36
Figura 12. Efecto del SNP sobre la arquitectura de la raíz de mutantes afectadas en síntesis y percepción de jasmonatos.	37
Figura 13. Niveles del ON en respuesta al SNP en la raíz de <i>Arabidopsis</i> .	39
Figura 14. Efecto del AJ sobre los niveles de ON en <i>A. thaliana</i> .	40
Figura 15. Efecto del AJ sobre los niveles de ON de plantas silvestres (Col-0) y la mutante <i>Atnoa1</i> .	42
Figura 16. Efecto del AJ sobre los niveles de ON de plantas silvestres (Col-0) y la mutante <i>coi1-1</i> .	43
Figura 17. Efecto comparativo del AJ y SNP sobre la expresión del gen <i>LOX2</i> de respuesta a AJ.	44
Figura 18. Expresión del gen <i>LOX2</i> de respuesta a AJ en las mutantes <i>Atnoa1</i> y <i>drr1</i> .	45
Figura 19. El óxido nítrico participa como molécula señalizadora en procesos fisiológicos mediados por el ácido jasmónico.	52

RESUMEN.

Las plantas son organismos que integran diversas señales ambientales a través de la síntesis, transporte y señalización de los reguladores de crecimiento, conocidos comúnmente como fitohormonas. El ácido jasmónico (JA) es un compuesto de naturaleza lipídica, que participa en respuestas de estrés, defensa y desarrollo. Recientemente, se determinó la participación del óxido nítrico (ON) en la respuesta del AJ en procesos de estrés por herida y en la alteración de la arquitectura radicular de *Arabidopsis* de manera similar al AJ. Por lo tanto, este trabajo se planteó para esclarecer posibles interacciones entre la señalización por AJ y ON. Inicialmente, se evaluó el efecto del AJ en la respuesta de tres mutantes afectadas en síntesis y señalización del ON, *Atnoa1*, *nia1 nia2* y *drr1*. Las tres líneas mutantes mostraron la misma sensibilidad que las plantas silvestres en la inhibición del crecimiento de la raíz primaria en respuesta al AJ. Sin embargo, interesantemente las mutantes *Atnoa1* y *drr1*, fueron resistentes a los efectos promotores del AJ sobre la formación de las raíces laterales. Estos resultados sugieren que el ON se encuentra participando como un mediador de las respuesta del AJ para la formación de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*. Por el contrario, las mutantes afectadas en la señalización por AJ *jar1*, *coi1-1* y *axr1-3* tratadas con el donador de óxido nítrico nitroprusiato de sodio (SNP), respondieron de manera similar que su parental silvestre. Mediante microscopía confocal se observó que el AJ induce un aumento en los niveles de ON, tanto en la raíz de plantas silvestres como en la mutante *Atnoa1*, mientras que en la mutante insensible a AJ *coi1-1* se presentó resistencia al incremento de los niveles de ON en la raíz inducido por AJ. Además, se determinaron los niveles de expresión del marcador de AJ *LOX2:GUS* en respuesta a SNP y AJ, evidenciando una mayor expresión del gen reportero de manera dosis dependiente en plantas tratadas con ambos compuestos. También se movilizó el marcador de respuesta a AJ *LOX2:GUS* al fondo mutante *Atnoa1* y *drr1* observando que en los dos fondos, los niveles de expresión del marcador se ven disminuidos en condiciones control, mientras que al ser inducidos con AJ se observó un aumento de la expresión sin

llegar a los niveles del control. Estos resultados en conjunto sugieren que el ON actúa cascada abajo de la señalización por AJ, participando como un mediador dependiente del AJ en la regulación de la arquitectura radicular de *Arabidopsis thaliana*. Específicamente los genes *AtNOA1* y *DRR1* participan como elementos de señalización en la formación de raíces laterales en respuesta al AJ. Los resultados en este estudio sugieren que el óxido nítrico regula la expresión del gen *LOX2* inducible por ácido jasmónico a través de la participación de los genes *AtNOA1* y *DRR1* los cuales funcionarían como elementos de señalización en la expresión de dicho gen.

1. INTRODUCCIÓN.

Las plantas son organismos capaces de adaptarse y responder a diversos estímulos ambientales para controlar su crecimiento y desarrollo. La regulación de estos procesos está mediada por diferentes compuestos denominados reguladores del crecimiento o fitohormonas, los cuales tienen un papel central en la integración de diversas señales ambientales y endógenas que modulan el programa genético de la planta (Santner y Estelle, 2009). Los primeros reguladores del crecimiento descritos fueron las auxinas, el ácido abscísico, las citocininas, las giberelinas y el etileno. Recientemente, otros compuestos se han identificado entre los que se incluyen a los brasinoesteroides, jasmonatos, ácido salicílico, óxido nítrico y algunos lípidos (Durbak *et al.*, 2012). La regulación del desarrollo en las plantas ocurre por procesos de división, expansión, diferenciación y muerte celular dando como resultado cambios morfogénicos que conducen a la germinación de la semilla, la floración, la maduración de frutos y la senescencia (Kepinski, 2006).

Los jasmonatos son fitorreguladores que modulan respuestas de estrés y del desarrollo, (Li *et al.*, 2004; Buchanan- Wollaston *et al.*, 2005; Glazebrook, 2005; Howe y Jander, 2008; Browse, 2009) mediante una reprogramación de la expresión génica a gran escala (Mandaokar *et al.*, 2006). Aunque se ha estudiado ampliamente la ruta de señalización de los jasmonatos, no se sabe si interactúa con otras moléculas para regular los procesos en los que participa. Recientemente, se determinó la participación del óxido nítrico (ON) en la respuesta del AJ al estrés por herida (Wünsche *et al.*, 2011). El ON es un mensajero celular involucrado en diferentes procesos celulares y fisiológicos en las plantas, incluyendo el cierre de estomas (Neill *et al.*, 2002), la floración (He *et al.*, 2004) y la germinación (Beligni y Lamattina, 2000). Además, el ON modula la expresión de genes involucrados en las vías de señalización de otras hormonas. En *A. thaliana* se ha observado que el ON regula la expresión de genes que participan en la síntesis y respuesta a jasmonatos (Orozco-Cárdenas y Ryan, 2002). Sin embargo, se desconocen las posibles interacciones entre los

jasmonatos y el ON en otros programas de desarrollo, como el de la raíz, por ejemplo.

2. ANTECEDENTES.

2.1. El modelo de estudio *Arabidopsis thaliana*.

Arabidopsis thaliana es una pequeña planta que pertenece a la familia de las Brassicáceas que ha llegado a ser uno de los modelos más importantes para el estudio de la biología del desarrollo al presentar una serie de ventajas como modelo de investigación: I) es una planta pequeña (30 cm) y de fácil de manipulación en condiciones de laboratorio. II) Presenta un ciclo de vida corto (6-8 semanas), fecundación autógama y produce numerosas semillas que permanecen viables durante varios años. III) su rápido crecimiento permite el análisis de un gran número de individuos. IV) posee alrededor de 25,000 genes, que en conjunto integran un genoma muy pequeño comparado con el de otras angiospermas y por lo tanto representa un sistema ideal para estudios genéticos y moleculares. V) se han establecido sistemas de transformación (ej. *Agrobacterium tumefaciens*) y de mutagénesis para el análisis de genes de interés (Mauch-Mani y Slusarenko, 1993).

2.2. La raíz de *Arabidopsis thaliana*.

La raíz de *Arabidopsis* es un modelo relativamente sencillo y apropiado para realizar investigaciones sobre procesos morfogénéticos. Las células que forman los diferentes tejidos se producen a partir de cuatro células madre localizadas en el ápice de la raíz, las cuales generan todos los tipos celulares por medio de divisiones estereotípicas seguidas de procesos de elongación y diferenciación. El crecimiento de la raíz primaria ocurre en el meristemo apical de la raíz (RAM, *root apical meristem*). El RAM produce células en dos direcciones, las del extremo distal de las raíces que dan origen a un tejido denominado cofia, el cual protege a la punta de la raíz en su paso a través del suelo. En la cofia también se perciben los estímulos ambientales, como la luz, la gravedad, los obstáculos, los gradientes de temperatura, la humedad, los nutrientes y otras sustancias, modulando así la dirección del crecimiento de dicho órgano (Scheres *et al.*, 2002).

El RAM además, produce células que forman la estructura de la raíz agrupadas en distintos tejidos: los haces vasculares, el periciclo, la endodermis, el córtex y la epidermis (Fig. 1). Como se mencionó antes, los distintos tejidos celulares se forman a partir de cuatro células madre (células iniciales) localizadas en el ápice de la raíz primaria y de las raíces laterales (Dolan *et al.*, 1993). En contacto con las células madre se encuentra un pequeño número de células denominado centro quiescente (QC), el cual presenta escasa actividad mitótica, siendo su función principal el mantenimiento de las células iniciales.

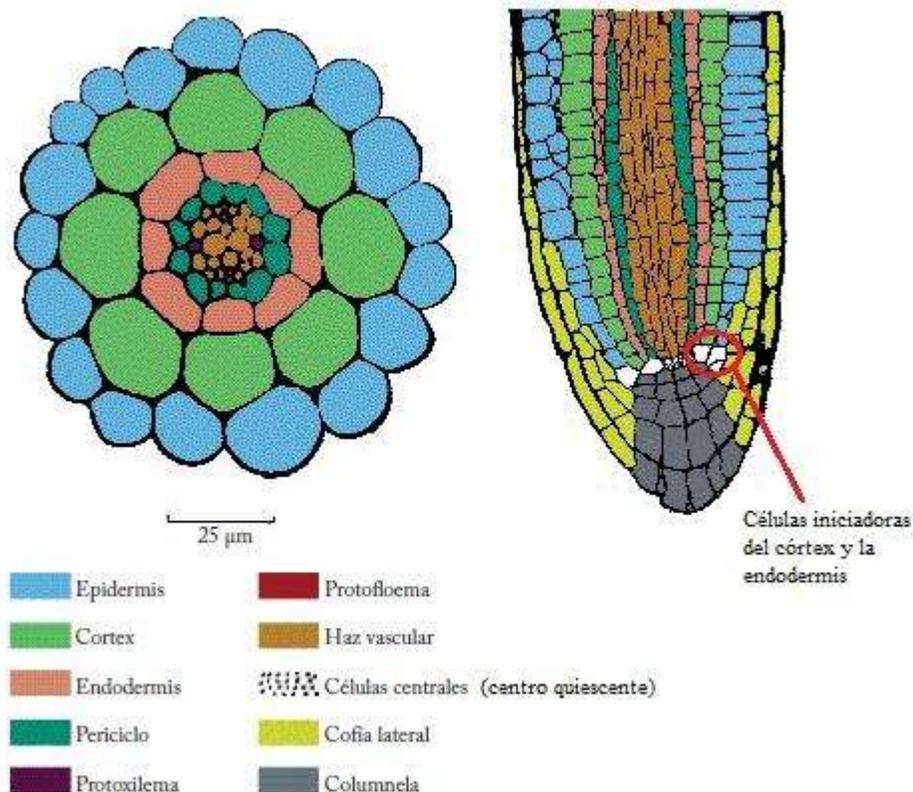


Figura 1. Estructura del sistema radicular de *Arabidopsis thaliana*. En el esquema se observan los cortes transversal y longitudinal de la raíz primaria donde se indican los diferentes tejidos que la conforman (Modificado de Ortiz-Castro y López-Bucio, 2010).

Conforme se incrementa el tamaño de la raíz, la zona de división celular o meristemática dará lugar a una región de expansión celular, denominada zona de elongación. Una vez que han incrementado su tamaño, las células se diferencian

alcanzando un tamaño y función específica, lo cual se puede apreciar con la aparición de pelos radiculares que son estructuras que emergen a partir de las células epidérmicas y participan en la absorción de agua y nutrientes. Un componente fundamental de la estructura radicular son las raíces laterales (RL), que tienen su origen a partir de células del periciclo, estos órganos aumentan la capacidad de exploración del suelo y aportan un mejor anclaje a la planta.

2.3. Reguladores del crecimiento.

Los reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas son un grupo de pequeñas moléculas orgánicas las cuales controlan el desarrollo vegetal desde la embriogénesis hasta la senescencia. Dicho control es llevado a cabo por la modulación de los programas celulares de división, expansión, diferenciación y muerte celular. Los primeros reguladores del crecimiento descritos fueron las auxinas, el ácido abscísico, las citocininas, las giberelinas y el etileno, recientemente diversos compuestos han sido también reconocidos por su actividad biológica, entre los que se incluyen a los brasinoesteroides, jasmonatos, ácido salicílico, óxido nítrico y algunos lípidos (Durbak *et al.*, 2012). Los reguladores del crecimiento funcionan como moléculas integradoras de información, cuyas vías de señalización interactúan con frecuencia para controlar la morfogénesis de la planta y su respuesta al medio ambiente (López-Bucio *et al.*, 2006).

Las fitohormonas integran diversos estímulos ambientales con el programa genético de la planta y comparten diversas características: I) se encuentran en bajas concentraciones en el interior de los tejidos, II) su biosíntesis, transporte y percepción se incrementa en respuesta a factores ambientales, III) comparten módulos de señalización, por lo que un regulador puede afectar múltiples respuestas en la planta y/o diferentes compuestos pueden incidir sobre un mismo aspecto del desarrollo (Gray, 2004). Los efectos fisiológicos en la morfogénesis vegetal con frecuencia dependen de la interacción de varias rutas hormonales sobre los tejidos en los cuales inciden.

2.4. Los jasmonatos.

El ácido jasmónico y sus derivados son reguladores del crecimiento descritos principalmente por su función en respuesta al estrés biótico y abiótico y en la regulación de procesos del desarrollo como la reproducción (Wasternack, 2007). Sin embargo, a pesar de la importancia de los jasmonatos como moléculas señalizadoras en la defensa y desarrollo, el conocimiento actual de los mecanismos moleculares de transducción de señales mediados por jasmonatos es muy limitado.

Los jasmonatos pertenecen a una familia de oxilipinas, ácidos grasos con uno o más átomos de oxígeno, derivados de la oxigenación enzimática de ácidos grasos tri-insaturados de 16 y 18 carbonos (Acosta y Farmer, 2010). El jasmonato más abundante en las plantas es el ácido jasmónico (AJ) el cual es clave en procesos de reproducción y defensa. El AJ puede ser modificado por metilación o conjugación para formar el metil jasmonato (MeJA) que es un compuesto volátil que media la comunicación intracelular y entre diferentes plantas, modulando respuestas de defensa y que además está implicado en la senescencia. Por otra parte, el compuesto conjugado jasmonoil-isoleucina (JA-Ile) es la forma activa involucrada en la señalización de los jasmonatos en hojas y posiblemente en las flores de *Arabidopsis* (Acosta y Farmer, 2010; Staswick y Tiryaki, 2004).

2.5. Síntesis de jasmonatos.

Las oxilipinas se originan a partir del ácido α -linolénico (18:3) liberado de las membranas de los cloroplastos por acción de enzimas fosfolipasas A_1 y A_2 las cuales hidrolizan en el primer y el segundo enlace éster entre el acilo y el glicerol y por las enzimas desaturasas, las cuales remueven el oxígeno de los ácidos grasos y crean dobles enlaces carbono-carbono (Narváez-Vásquez *et al.*, 1999; Ishiguro *et al.*, 2001). El ácido α -linolénico liberado de la membrana de los cloroplastos por actividad de las lipasas es el sustrato de numerosos componentes oxigenados denominados colectivamente oxilipinas entre los que se incluyen los jasmonatos, que comprenden al AJ, MeJA, JA-Ile y otros metabolitos con actividad biológica como el (9S, 13S)-12-oxo-ácido fitodienóico (OPDA) (Wasternack, 2007). La

biosíntesis de las oxilipinas se activa por acción de las lipoxigenasas (LOXs), las cuales forman hidroperóxidos a partir del ácido graso insaturado, los que a su vez son sustratos de la enzima aleno óxido sintasa (AOS) para formar el compuesto inestable ácido 12,13-(S) ácido epoxilinolénico, el cual es ciclado por la enzima aleno óxido ciclasa (AOC). Esta enzima determina la configuración de OPDA, este estereoisómero es inducido en alrededor de un 99% en plantas con heridas. La isoenzima específica OPDA reductasa, en *Arabidopsis thaliana* codificada por el gen *OPR3*, es requerida para reducir el OPDA a 3-oxo-2 (cis-2-pentenil)-ciclopentanona- ácido octanoico (OPC-8:0), el cuál es convertido a AJ por tres ciclos de β -oxidación (Fig. 2) (Browse, 2009). La síntesis de OPDA ocurre en el cloroplasto, mientras que la producción final de AJ acontece en el peroxisoma, el único lugar conocido de β -oxidación en las plantas (Ziegler *et al.*, 2000).

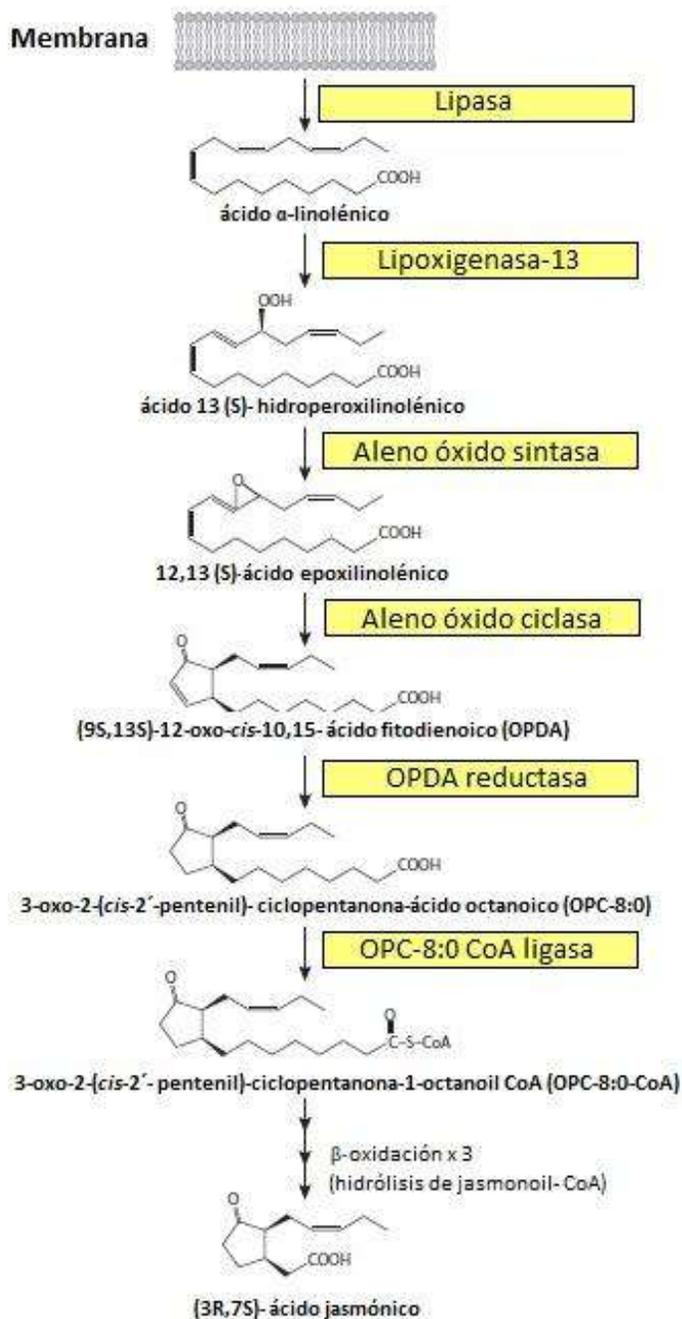


Figura 2. Síntesis del ácido jasmónico. Vía de síntesis del AJ a partir del ácido α -linolénico. Las estructuras muestran la configuración de los intermediarios. Las enzimas principales de la vía se muestran en recuadros amarillos (Modificado de Browse, 2009).

2.6. Metabolitos del ácido jasmónico (AJ).

El AJ es sometido a diferentes transformaciones enzimáticas para generar varios derivados que difieren en su actividad biológica. Entre las principales rutas del metabolismo del ácido jasmónico están las siguientes: I) metilación del carbono-1 (C1) para producir el compuesto volátil MeJA, el cual modula la señalización entre diferentes plantas (Farmer y Ryan, 1990); II) descarboxilación del C1 para formar el compuesto volátil *cis*- jasmón; III) hidroxilación del C12 o C11 para producir el ácido tuberónico y la liberación de derivados que pueden ser modificados por sulfuración o glicosilación; IV) reducción del C6 para formar el ácido curcúbico, el cual puede ser esterificado y V) conjugación del grupo carboxilo a isoleucina (Ile) y otros aminoácidos para producir el JA-Ile y el jasmonoil L-triptófano, el cual es un inhibidor activo de la señalización de auxinas en la raíz de *Arabidopsis* (Browse, 2009; Staswick, 2009).

En *Arabidopsis*, el JA-Ile es sintetizado por una enzima codificada por el gen *JAR1* (Staswick *et al.*, 1992). Las mutantes deficientes en el locus *jar1* son deficientes en la respuesta a AJ, indicando que el JA-Ile es una señal primaria importante en la respuesta a AJ. En la mutante *jar1*, los niveles de JA-Ile están disminuidos en más de cinco veces comparado con las plantas silvestres en condiciones control y bajo estrés por herida, sin embargo, la síntesis de AJ y la activación de los genes de respuesta a AJ es similar en ambas. Esto sugiere que niveles bajos de JA-Ile son suficientes para mediar la expresión de genes de respuesta a AJ. Sin embargo, el fenotipo de la mutante *jar1* indica niveles bajos de JA-Ile (Staswick y Tiryaki, 2004).

2.7. Señalización de los jasmonatos.

Una vez sintetizados los jasmonatos son probablemente reconocidos y movilizados por transportadores específicos entre células (Beckers y Spoel, 2006). Sin embargo, la identidad de estos transportadores y su localización permanecen desconocidas.

Gran parte del conocimiento asociado a la acción de los jasmonatos proviene de la identificación de mutantes de *Arabidopsis* incapaces de sintetizar o

de responder al AJ. Una de las primeras mutantes identificadas fue *coi1*, aislada por su resistencia a la fitotoxina coronatina la cual mimetiza molecularmente al JA-Ile (Fig. 3). La principal característica de *coi1* es la esterilidad masculina y la insensibilidad a los efectos producidos por el MeJA y la toxina coronatina, producida por *Pseudomonas syringae* (Feys *et al.*, 1994). El gen *COI1* codifica para una proteína de 66 kDa, que en su región N-terminal presenta un motivo de tipo F-box y un motivo repetido rico en leucina. Las proteínas tipo F-box son componentes del complejo multiproteico SCF (Skp1/Culina/E-box) que pertenece al tipo E3 ubiquitina ligasa que media la ubiquitinación de proteínas para su degradación por el proteosoma 26S (Xie *et al.*, 1998).

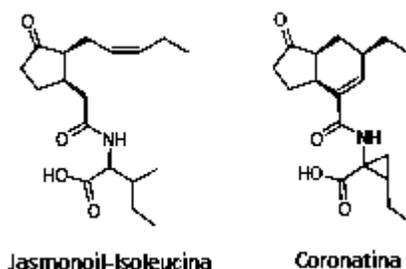
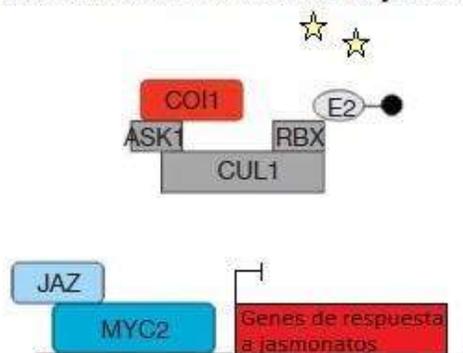


Figura 3. Comparación estructural del jasmonoil-isooleucina y la coronatina. Las estructuras muestran la semejanza de la forma activa de los jasmonatos JA-Ile y de la fitotoxina bacteriana coronatina (Modificada de Browse, 2009).

Posteriormente, Yan *et al.*, (2009) mediante estudios bioquímicos demostraron la unión directa de JA-Ile con COI1, lo que sugiere que éste último podría participar como receptor en la vía de señalización de los jasmonatos. Además, se demostró que COI1 interactuaba con una histona deacetilasa (proteína involucrada en la represión de la transcripción) sugiriendo que COI1 podría también desreprimir la activación de genes regulados por jasmonatos al marcar a sus represores para su ubiquitinación y subsecuente degradación (Fig. 4) (Devoto *et al.*, 2002). Los represores de la transcripción de genes de respuesta a jasmonatos son las proteínas JAZ que poseen un dominio ZIM dependiente del complejo SCF^{COI1} y un motivo Jas el cual sirve para interactuar con los factores transcripcionales tipo bHLH (hélice-vuelta-hélice básica) que activan la transcripción

de genes a través de la percepción de jasmonatos, entre los que se incluyen a los genes *JAZ* y de la síntesis de jasmonatos como *LOX2* (Chini *et al.*, 2007; Pauwels *et al.*, 2008). Una rápida transcripción de genes *JAZ* inducida por jasmonatos, sugiere un mecanismo de regulación negativo.

Baja concentración intracelular de jasmonatos



Alta concentración intracelular de jasmonatos

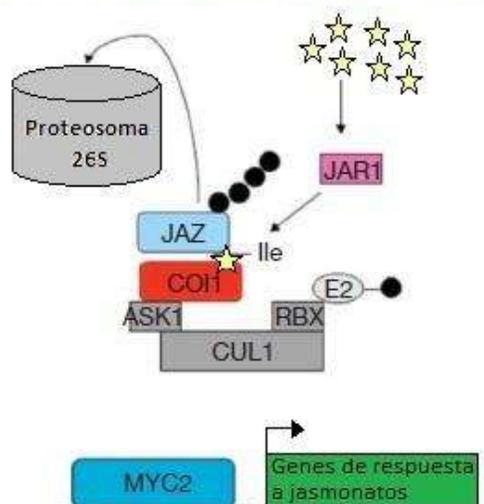


Figura 4. El complejo SCF^{COI1} es requerido para la señalización de jasmonatos. El complejo SCF^{COI1} está formado por la proteína de la familia SKP1 ASK1, la proteína de la familia de las CULINAS CUL1 y la de la caja F COI1. La unión de jasmonoil- isoleucina (JA-Ile) al receptor CORONATINE-INSENSITIVE1 (COI1) promueve la unión de los represores de jasmonatos ZIM-Domain (JAZ) y su ubiquitinación, resultando así en la liberación del factor de transcripción MYC2 y la transcripción de genes de respuesta a jasmonatos (Modificado de Santner y Estelle, 2009).

2.8. Funciones de los jasmonatos.

2.8.1. Inmunidad vegetal.

Los jasmonatos juegan un papel clave en la activación de genes involucrados en respuestas de defensa en contra de estrés abiótico, como la sequía y la radiación UV y en respuesta a estrés biótico como la herbivoría y el ataque de patógenos microbianos (Avanci *et al.*, 2010).

Los jasmonatos son las principales moléculas de defensa en contra de la herbivoría, se estima que en hojas de *Arabidopsis* regulan del 67-85% de los genes de defensa ante el ataque de insectos y otros herbívoros, incluyendo a los que codifican para las proteínas de la síntesis y percepción de los jasmonatos, así como para las implicadas en el flujo de iones y en la adaptación al estrés en general (Reymond *et al.*, 2004). La producción de jasmonatos induce la formación de tricomas en las hojas, los cuales confieren protección contra los herbívoros a la lámina foliar (Yoshida *et al.*, 2009). Sin embargo, también regulan negativamente la expresión de genes que codifican para la síntesis de enzimas y otras proteínas involucradas en el crecimiento y metabolismo, entre las que se incluyen las de la fotosíntesis, por ejemplo la ferredoxina (Bilgin *et al.*, 2010; Herms y Mattson, 1992).

Un mecanismo usado en plantas para mejorar la inmunidad es la comunicación cruzada entre distintas vías de señalización de hormonas, que a su vez está influenciado por procesos como la adaptación al estrés biótico y abiótico. Distintos estudios han demostrado que las plantas, después de reconocer a un patógeno son capaces de activar vías de señalización mediante la interacción sinérgica o antagónica de estas (Kazan y Manners, 2008). Generalmente, el ácido salicílico forma parte de la defensa en contra de algunos insectos y de patógenos biótrosos, los cuales causan enfermedades en hojas o raíz. Un ejemplo es la bacteria *Pseudomonas syringae*, la cual produce la toxina coronatina (COR) que funciona como un potente factor de virulencia y que mimetiza al JA-Ile, activando la vía de señalización del ácido jasmónico y suprimiendo la del ácido salicílico (Kunkel y Brooks, 2002).

El AJ es un mediador importante en contra de patógenos que se alimentan de tejidos muertos o algunos hongos necrótrofos. Se ha descrito que el AJ actúa sinérgicamente con el etileno durante esta respuesta inmune y que activan la transcripción de genes cuyos productos protegen a las plantas de este ataque. Se ha propuesto al factor de transcripción de respuesta a etileno ERF1 como el integrador de las vías del AJ y el etileno en respuesta a necrótrofos (Lorenzo *et al.*, 2003).

2.8.2. Regulación del desarrollo.

La adecuada síntesis y señalización de jasmonatos es de gran importancia en el proceso de reproducción y formación de órganos sexuales en las flores tanto de plantas monocotiledóneas como en dicotiledóneas (Avanci *et al.*, 2010). Los jasmonatos son esenciales para la maduración del polen, la elongación de los filamentos de los estambres y la apertura de los estambres que permite la liberación del polen (Delker *et al.*, 2006). Existe una evidencia clara de lo anterior, sustentada en el fenotipo de las flores en las mutantes de *Arabidopsis* afectadas en la síntesis de AJ y en el receptor de jasmonatos COI1, que muestran esterilidad masculina. La aplicación exógena de AJ puede restaurar la fertilidad en las mutantes afectadas en la síntesis, mientras que la mutante *coi1* es incapaz de producir polen viable (von Malek *et al.*, 2002).

Otro proceso importante del desarrollo en la que participan los jasmonatos es la regulación de la arquitectura de la raíz. El tratamiento de plantas de *A. thaliana* con AJ causa el acortamiento de la raíz primaria y promueve la formación de raíces laterales. Adicionalmente, se ha observado que las mutantes afectadas en los componentes de la síntesis y de la transducción de señales dependientes de COI1 presentan una reducción en el crecimiento de la raíz primaria (Wasternack 2007). La participación del MeJA en la formación de raíces laterales, está relacionada con la biosíntesis de auxinas dependiente del gen *ANTHRANILATE SYNTHASE a1 (ASA1)* y la atenuación del transporte de auxinas al disminuir los niveles de expresión de los transportadores de eflujo de auxinas PIN1 y PIN2 (Sun *et al.*, 2009). Los jasmonatos también inducen la senescencia

(Schommer *et al.*, 2008), lo cual se atribuye a la regulación de los genes involucrados en la fotosíntesis y los relacionados a la defensa en contra de estrés biótico y abiótico (Wasternack, 2007).

2.9. El óxido nítrico (ON).

El óxido nítrico (ON) es un radical libre debido a que contiene un electrón desapareado, de naturaleza gaseosa y que en células animales funciona como molécula de señalización involucrada en numerosos procesos fisiológicos como la relajación del músculo liso vascular, inhibidor de la agregación plaquetaria, neurotransmisor, regulador del consumo de oxígeno en la mitocondria y la defensa inmunológica. El ON es sintetizado por la acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), la cual cataliza la oxidación dependiente de NADPH de L-arginina a L-citrulina y ON (Stuehr *et al.*, 2004). Sin embargo, el ON no es exclusivo del reino animal, en las últimas dos décadas se ha demostrado la capacidad de las plantas para acumular y metabolizar el ON. Además, diversos estudios indican la síntesis de ON en plantas a través de reacciones enzimáticas y no enzimáticas que se revisarán posteriormente. Interesantemente, se ha investigado el papel del ON como molécula importante en distintos procesos del desarrollo como xilogénesis, apoptosis, defensa contra patógenos, floración, cierre de los estomas y gravitropismo (Neill *et al.*, 2003).

También se ha reportado que el ON participa en la modulación de la expresión de genes que codifican proteínas para la biosíntesis de AJ, la fotosíntesis y la apoptosis (Polverari *et al.*, 2003) y para la interacción con otras rutas hormonales incluyendo las del ácido abscísico, citocininas y etileno (Orozco-Cardenas y Ryan, 2002; Correa-Aragunde *et al.*, 2006). Esta información sugiere que en muchos aspectos la señalización del ON es compartida por plantas y animales (Wendehenne *et al.*, 2001).

2.10. Síntesis de óxido nítrico.

En las células vegetales se han descrito dos vías enzimáticas de síntesis de ON: una dependiente de nitrito/nitrato y otra dependiente de L-Arg (Fig. 5) (Neill *et*

al., 2008). Además, se ha sugerido otra fuente de síntesis de ON a partir de nitrito a través de una reacción no enzimática en el apoplasto (Bethke *et al.*, 2004).

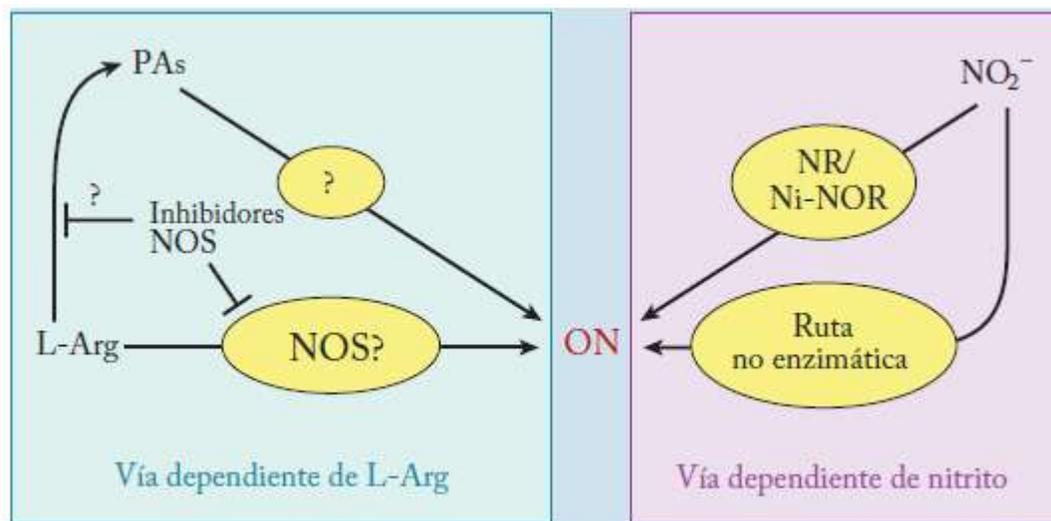


Figura 5. Biosíntesis de ON en plantas. El ON puede ser sintetizado por dos vías, la vía dependiente de nitrito que involucra una ruta enzimática en la que las nitrato reductasa (NR) y la reductasa de nitrito a ON (NiNOR) catalizan la síntesis del ON y otra ruta no enzimática que comprende reacciones químicas de reducción. La vía aún no caracterizada dependiente de L-arginina implica la participación de una enzima similar a la óxido nítrico sintasa (NOS) y otra ruta que utiliza poliaminas (PAs) como sustrato (Modificada de Besson-Bard *et al.*, 2008).

La vía dependiente de nitrito/nitrato implica la participación de las enzimas nitrato reductasa (NR) citosólica (Yamasaki y Sakihama, 2000) y la reductasa de nitrito a ON (Ni-NOR) de la membrana plasmática específica de células de la raíz (Stohr *et al.*, 2001). La NR cataliza la producción de ON a partir de nitrito, reacción dependiente de la donación de electrones del NADPH. Esta reacción se ha demostrado *in vivo* con el uso de mutantes de la NR en plantas de haba (Dean y Harper, 1986) y en condiciones *in vitro* usando la NR purificada de extractos de hojas de girasoles y espinacas (Rockel *et al.*, 2002). La producción de ON por las NR depende de la fosforilación, una modificación postraducciona en una serina dependiente de magnesio y calcio, la cual lleva a la inactivación de la enzima (Lillo *et al.*, 2004).

La primera evidencia genética del papel fisiológico de la generación de ON vía la NR fue en el cierre de estomas inducido por ácido abscísico (ABA) en

células guardianas de *Arabidopsis*. En el genoma de *Arabidopsis* existen dos genes que codifican para NR, *NIA1* y *NIA2*, los cuales tienen un alto porcentaje de identidad (83.5%). El uso de la doble mutante *nia1nia2* de *Arabidopsis* confirmó el papel de la NR sobre el cierre de estomas en células guardianas debido a su resistencia en respuesta a ABA (Desikan *et al.*, 2004). La biosíntesis de ON mediada por la NR puede ser inducida por factores bióticos y abióticos, como elicitores, estrés osmótico, transición floral, formación de raíces laterales inducida por auxinas e hipoxia (Gupta *et al.*, 2011). Otra enzima involucrada en la síntesis de ON a partir de nitrito es la Ni-NOR. Esta enzima actúa en conjunto con la NR, la cual abastece de nitrito a la Ni-NOR (Stohr *et al.*, 2001). Esta enzima participa en procesos fisiológicos de la raíz, que incluyen la asimilación de nitrato disponible en la rizosfera, respuestas a condiciones de hipoxia y en la interacción con hongos micorrízicos (Moche *et al.*, 2010). También se han reportado otros mecanismos de síntesis de ON, tales como reducción química de nitrito a ON en pH ácido en el apoplasto (Bethke *et al.*, 2004) y la reducción de nitrito a ON ocasionada por la cadena transportadora de electrones en la mitocondria (Planchet *et al.*, 2005).

La L-arginina es el sustrato para la síntesis de poliaminas, como la espermina y espermidina. La aplicación exógena de poliaminas en la zona de la raíz y tricomas de hojas de *Arabidopsis* indujo un incremento en los niveles de ON, detectado por fluorescencia (Tun *et al.*, 2006). Lo que indica que la síntesis de poliaminas a partir de arginina está involucrada en la producción de ON. Sin embargo, no se conocen los intermediarios de esta vía (Yamasaki y Cohen, 2006). Aunque no se ha encontrado ningún homólogo de la NOS animal en el genoma de *Arabidopsis*, se ha sugerido que la vía dependiente de la L-arg puede involucrar a una enzima con características similares a esta enzima. Sustentando lo anterior, se han encontrado actividades similares a la NOS en distintos tejidos vegetales como hojas, tallo y raíz de plántulas de chícharo, así como en algunos orgánulos purificados como mitocondria y peroxisoma (Corpas *et al.*, 2006, Corpas *et al.*, 2009). La primera evidencia genética de una enzima parecida a la NOS identificada en *Arabidopsis* fue la identificación del gen llamado *AtNOS1*. La proteína codificada por este gen mostró secuencias similares con una proteína

involucrada en la síntesis de ON en el caracol *Helix pomatia* (Guo *et al.*, 2003). En la búsqueda sobre las funciones de *AtNOS1*, se aisló la mutante *Atnos1*, en la cual se observaron niveles disminuidos de ON en células guardianas de la raíz en respuesta a ABA. En este y otros estudios, se sugirió que la mutante *Atnos1* es deficiente en la síntesis de ON y en su acción (He *et al.*, 2004; Zeidler *et al.*, 2004; Bright *et al.*, 2006). Aunque la mutante *Atnos1* presenta niveles disminuidos de ON, su función como NOS ha sido cuestionada debido a que en distintas investigaciones ha sido imposible reproducir la actividad típica de la NOS usando bioensayos de conversión de arginina a citrulina (Zemojtel *et al.*, 2006). Con base en lo anterior, se ha sugerido que dicha enzima probablemente está involucrada en algún paso en la síntesis o señalización de ON y por esta razón *AtNOS1* fue renombrada como *AtNOA1* (*Arabidopsis thaliana Nitric Oxide Associated 1*). Estudios genéticos y de análisis estructural revelaron que *AtNOA1* presenta un dominio conservado de GTPasa y que está involucrada en la biogénesis ribosomal de las mitocondrias (Guo y Crawford, 2005; Crawford *et al.*, 2006) y de los cloroplastos (Flores-Pérez *et al.*, 2008). Debido a que estos sitios son fuentes importantes de transferencia de electrones y de producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), se propone que en la mutante *Atnoa1* existen niveles elevados de ERO, las cuales pueden reaccionar rápidamente con el ON y así reducir los niveles detectables de ON (Moreau *et al.*, 2008). La mutante *Atnoa1* debido a su fenotipo, es útil para elucidar vías de señalización en las que participa el ON.

2.11. Percepción y transducción de la señal del ON en plantas.

Aunque hasta la fecha no se ha identificado ningún receptor de ON, por su naturaleza, este radical es muy reactivo y puede interactuar con numerosas proteínas. En células animales, la guanilato ciclasa soluble (GCs) tiene un papel fundamental en la señalización de ON, donde este último se une al dominio hemo de la GCs estimulando la liberación del monofostato de guanosina cíclico (GMPc) que a su vez activa distintos blancos celulares. En las plantas, estudios farmacológicos usando inhibidores del ON como el 2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazol-1-oxi-3-óxido (PTIO) o el 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazol-1-

oxi-3-óxido (cPTIO) en células guardianas de los estomas, han implicado al GMPc y a la señalización por ácido abscísico (ABA) río abajo del ON (Neill *et al.*, 2003). El ON induce un incremento de GMPc y activa cascadas de señalización que modulan la expresión génica (Grün *et al.*, 2006). Una molécula esencial río abajo del GMPc es la ADP ribosa cíclica (ADPRc). En células animales, la ADPRc estimula la liberación de Ca^{2+} intracelular, activando al receptor rianodina (RyR)(denominado así por su alta afinidad al alcaloide rianodina) de los canales de calcio y es posible que un mecanismo de señalización similar ocurra en plantas. En tabaco, el ADPRc eleva la expresión genética de la fenilalanina amonio liasa (PAL) y la proteína 1 relacionada con patogénesis (PR-1), que es sensible a los inhibidores del RyR. Los genes de las proteínas antes mencionadas también son regulados por el ON y los antagonistas de ADPRc reducen la expresión de PR-1. El ON causa un incremento en los niveles de Ca^{2+} libre, por lo tanto podría actuar a través del GMPc, ADPRc y Ca^{2+} para promover el cierre de estomas inducido por ABA en células guardianas. La inhibición por cPTIO durante este proceso inducido por ABA lleva a la inactivación de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} y a la activación de los canales de Cl^- , lo que implicaría fuertemente al ON y el Ca^{2+} en la cascada de señalización por ABA (Neill *et al.*, 2008). En animales, la S-nitrosilación es un mecanismo de modificación post-traduccional que regula numerosos procesos de señalización y vías metabólicas. En plantas, se ha reportado que la S-nitrosilación de proteínas juega un papel importante en la señalización del ON. En extractos de cultivos de células de *Arabidopsis* tratados con glutatión S-nitrosilado (GSNO), se han aislado proteínas que contienen grupos S-nitrosilados (S-ON) que están involucradas con el estrés oxidativo, la señalización, la estructura celular y el metabolismo (Lindermayr *et al.*, 2005). También es posible que el ON interactúe nitrando residuos de tirosina a través de especies reactivas de nitrógeno como el anión peroxinitrito (ONOO^-) y el dióxido de nitrógeno (NO_2) que se forman durante el metabolismo del ON en presencia de especies reactivas de oxígeno y centros de metales de transición. La nitración de tirosina de proteínas endógenas ha sido demostrada en líneas antisentido de tabaco para la nitrato reductasa (NiR) donde se observaron

cantidades incrementadas de ON (Morot-Gaudry-Talarmain *et al.*, 2002) (Fig. 6). Estudios recientes mostraron la participación de la proteína cinasa 6 activada por mitógenos (MPK6) en la señalización por ON, donde se encontró que la MPK6 y la nitrato reductasa (NIA2), interactúan *in vitro* e *in vivo*. En dicha interacción MPK6 fosforila a NIA2, aumentando la producción de ON, lo que finalmente condujo a cambios morfológicos en el sistema radicular de *Arabidopsis* (Wang *et al.*, 2010).

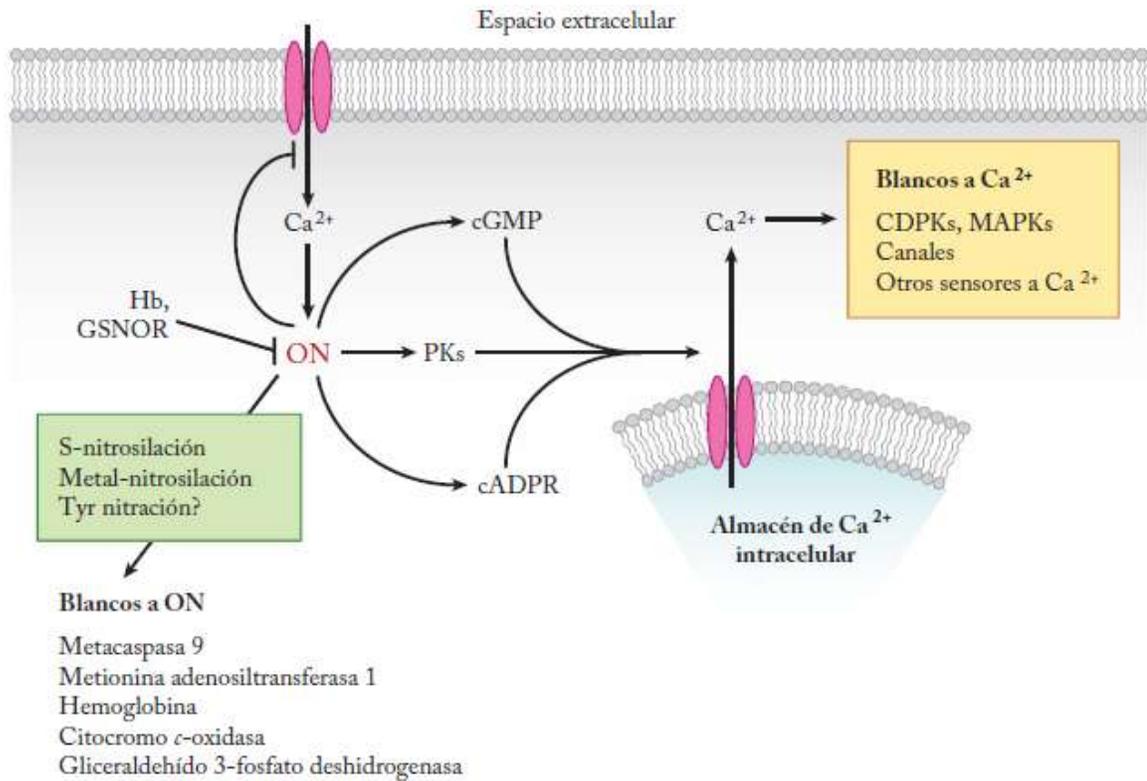


Figura 6. Señalización del ON en la célula vegetal. El efecto del ON puede ser transducido por varios procesos. Primero, el ON modula la actividad de ciertas proteínas mediante la S- y/o metal-nitrosilación. Algunos ejemplos incluyen la metacaspasa 9, metionina adenosiltransferasa 1, hemoglobina (Hb), citocromo c -oxidasa y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. La Tyr-nitración se ha propuesto como un mecanismo adicional, pero aún no se ha demostrado en su totalidad. Segundo, el ON induce un aumento de la concentración de Ca^{2+} citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) activando canales permeables a Ca^{2+} intracelular relacionados a receptores de rianodina. La regulación de otros canales permeables a Ca^{2+} como los de la membrana plasmática, el retículo endoplásmico, la vacuola, la mitocondria y cloroplastos, es otra posibilidad de la ruta de señalización del ON. Estos procesos activan segundos mensajeros como: ADP ribosa cíclico (cADPR), GMP cíclico (cGMP), proteínas cinasas (PKs). La elevación de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ modula la actividad de proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} (CDPKs), proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPKs) y canales sensibles a Ca^{2+} , incluyendo canales iónicos de Cl^- y K^+ , reportados en células guardianas (Modificado de Besson-Bard *et al.*, 2008).

2.12. Interacción de los jasmonatos con el ON.

Diferentes evidencias han implicado al ON como un modulador de las respuestas a heridas y/o estrés mecánico (Garces *et al.*, 2001). En jitomate, la generación de H₂O₂ inducido por herida inhibió la producción de ON y la expresión de genes para la síntesis de ácido jasmónico. Por otra parte, se ha reportado que el ON tiene un papel fundamental en la regulación de la expresión de genes de defensa inducidos por herida durante la patogénesis (Orozco-Cardenas y Ryan, 2002). Estudios realizados en hojas de *Arabidopsis* mostraron que en respuesta a heridas y a tratamientos con AJ, se incrementó la concentración de ON, lo que proporcionó una evidencia del posible entrecruzamiento entre la señalización o respuestas del AJ y el ON (Huang *et al.*, 2004). Actualmente se sabe que tanto el AJ como el ON están involucrados en la modulación de la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana* acortando la longitud de la raíz primaria e incrementando el número de raíces laterales (Campos-Cuevas *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2009; Méndez-Bravo *et al.*, 2010). El aislamiento y caracterización de la mutante *decanamide resistant root1 (drr1)*, reveló posteriormente que el AJ interactúa con las alcamidas en los procesos de senescencia y desarrollo de la raíz y que esta mutante es resistente a la inhibición del crecimiento de la raíz primaria por el ON (Méndez-Bravo *et al.*, 2010; Morquecho-Contreras *et al.*, 2010), indicando que este es un posible elemento de interacción entre la vía del AJ y el ON. Sin embargo, se desconoce a qué nivel estas moléculas de señalización interactúan en la regulación de la arquitectura radicular de *Arabidopsis*.

3. JUSTIFICACIÓN.

El óxido nítrico participa en procesos de estrés asociados a la señalización por ácido jasmónico y ambas moléculas regulan eventos similares sobre el desarrollo de la raíz, por lo tanto es importante esclarecer las posibles interacciones en la respuesta del ácido jasmónico y del óxido nítrico sobre la arquitectura radicular de *Arabidopsis thaliana*.

4. HIPÓTESIS.

El óxido nítrico participa como mensajero celular en la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana* regulando las respuestas al ácido jasmónico.

5. OBJETIVOS.

5.1. Objetivo general.

Evaluar la participación del óxido nítrico en la regulación del desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a ácido jasmónico.

5.2. Objetivos específicos.

- Caracterizar el efecto del ácido jasmónico sobre la raíz de plantas silvestres y mutantes de *Arabidopsis* afectadas en la síntesis y señalización del óxido nítrico.
- Estudiar el efecto del ácido jasmónico sobre los niveles de óxido nítrico en la raíz de plantas silvestres y mutantes afectadas en la síntesis y señalización al óxido nítrico.
- Determinar los niveles de expresión del gen inducible por ácido jasmónico *LOX2* en respuesta al óxido nítrico.
- Estudiar la regulación del gen *LOX2:GUS* en los fondos mutantes *Atnoa1* y *drr1*.
- Evaluar la respuesta del óxido nítrico en las mutantes resistentes al ácido jasmónico.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1. Material biológico.

Se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* de los ecotipos Columbia (Col-0) y Wassilewskija (Ws), así como diferentes mutantes con niveles disminuidos de ON: *Atnoa1* (Guo *et al.*, 2003), *nia1 nia2* (Wilkinson and Crawford, 1993) (fondo genético Col-0) y *drr1* (Morquecho-Contreras *et al.*, 2010) (fondo genético Ws) y las mutantes afectadas en síntesis y percepción de jasmonatos *jar1-1* (Staswick *et al.*, 1992), *coi1-1* (Feys *et al.*, 1994) y *axr1-3* (Tiryaki and Staswick, 2002) (fondo genético Col-0).

6.2. Compuestos químicos.

El ácido jasmónico, así como el donador del óxido nítrico, nitroprusiato de sodio (SNP), fueron adquiridos de Sigma. El AJ fue disuelto en etanol, mientras que el SNP en dimetil sulfóxido (DMSO). En plántulas control se adicionó el solvente respectivo en un volumen equivalente a la concentración más alta del compuesto en el bioensayo.

6.3. Preparación de las semillas.

Para realizar los bioensayos en condiciones axénicas, primeramente las semillas de las diferentes líneas se sometieron a una desinfección superficial, colocándolas en un tubo Eppendorf; después se agregaron 500 µl de etanol al 96% v/v y se sometieron a agitación durante 5 min. Transcurrido el tiempo, se retiró el etanol y se adicionó 700 µl de hipoclorito de sodio al 20% v/v, y se agitó por 7 min. Finalmente, se retiró el hipoclorito de sodio y se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril. Todo este proceso fue llevado a cabo en una campana de flujo laminar. Finalmente, las semillas fueron colocadas en oscuridad a 2 °C durante 48 horas, para estimular y homogenizar la germinación.

6.4. Condiciones de crecimiento.

Las semillas desinfectadas fueron sembradas y cultivadas bajo condiciones de esterilidad en cajas de Petri conteniendo 30 ml de medio de Murashige y Skoog (MS) 0.2X, el cual contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas, suplementado con 0.6% de sacarosa y 1% de agar. El pH del medio se ajustó a 7.0 con KOH 0.1 N. Una vez preparado el medio, éste se somete a esterilización en autoclave (120 °C y 15 lb de presión durante 20 min.). El medio MS normal contiene 2.0 mM NH_4NO_3 , 1.9 mM KNO_3 , 0.3mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.15 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 5 μM H_3BO_3 , 0.1mM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.3 mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 μM $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.1 μM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 mM $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, inositol (10 mg.L⁻¹) y Glicina (0.2mg.L⁻¹). Se colocaron en una cámara Percival AR95L para optimizar el crecimiento, la cual contiene condiciones controladas: 22°C de temperatura, un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad y 80% de humedad.

6.5. Análisis de crecimiento.

El sistema radicular de *Arabidopsis* y la integridad del meristemo de la raíz, fueron analizados con un microscopio estereoscópico (Leica, MZ6). Las raíces laterales emergidas de la raíz primaria se observaron con el objetivo de 3x y se cuantificaron para los valores de raíces laterales que fueron graficados. Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital SAMSUNG SCC 131-A adaptada al microscopio. La longitud de la raíz primaria se determinó para cada una de las raíces, utilizando una regla. El número de raíces laterales se obtuvo contando las raíces laterales por plántula, y la densidad de raíces laterales, dividiendo el número de raíces laterales entre la longitud de la raíz primaria, para cada una de las plántulas. En los ensayos de transferencia, las raíces laterales fueron cuantificadas de la punta de la raíz a la zona de inicio de la transferencia. Para todos los experimentos con las líneas silvestres y mutantes, los datos fueron analizados estadísticamente usando el programa Statistic 6.0. Se graficaron las medias de cada tratamiento con su respectivo error estándar y para analizar la validez de los resultados encontrados, se realizó un análisis de una sola variante o

multi-variante seguida por una prueba post-hoc de Tukey. Se utilizaron letras diferentes para indicar las medias con diferencia significativa ($P < 0.05$).

6.6. Detección de óxido nítrico por microscopía confocal.

Los niveles endógenos de óxido nítrico fueron monitoreados incubando las plántulas de *Arabidopsis* con 1 μM del fluorocromo DAF-2DA (Kojima *et al.*, 1998) en Tris-HCl 0.1 M (pH=7.4). Las plántulas crecidas en condiciones control y en presencia de los diferentes compuestos se incubaron durante 30 minutos en obscuridad, transcurrido este tiempo se colocaron en un portaobjetos con 100 ml de amortiguador y se cubrieron con un cubreobjetos para su posterior análisis. Las señales fluorescentes se detectaron usando un microscopio confocal de escaneo láser (Olympus; modelo BX50) y fueron monitoreadas con un láser de argón con un rango de excitación de 488-568 nm y 585-610 de emisión. Las señales fluorescentes se cuantificaron analizando el número de píxeles en el canal verde utilizando el software Image J.

6.7. Análisis histoquímico.

Para el análisis histoquímico de la actividad de GUS, las plántulas transgénicas de *Arabidopsis LOX2:GUS* se sumergieron en amortiguador de reacción de GUS (0.5 mg ml⁻¹ de 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-gluocurónido en fosfato de sodio 100 mM, pH=7) donde se incubaron por 14 horas a 37 °C. Las plántulas así teñidas fueron clareadas mediante el método de Malamy y Benfey (1997). Para cada tratamiento, al menos 10 plántulas fueron analizadas. Una plántula representativa fue elegida para cada tratamiento y fotografiada utilizando el microscopio Leica CME.

6.8. Obtención de cruzas.

Para obtener a las mutantes *Atnoa1* y *drr1* que portan el marcador *LOX2:GUS*, el polen de la línea transgénica se utilizó para fertilizar una de las flores de la mutante. La silicua de la crusa fue marcada y posteriormente la semilla de esa silicua fue desinfectada y sembrada en medio MS 0.2X. Se seleccionaron

las plantas con fenotipo silvestre y fueron crecidas en suelo hasta la obtención de semillas, estas últimas fueron desinfectadas y sembradas en medio MS 0.2X, las plantas de fenotipo mutante, las cuales tuvieron una segregación mendeliana 3:1; fueron crecidas en suelo hasta la obtención de semillas. Las semillas de cada planta fueron almacenadas por separado y a cada lote se le realizó un análisis histoquímico de la actividad GUS, aquellos lotes que mostraron la actividad GUS y fenotipo mutante fueron propagados una vez más para asegurar que las semillas fueran homocigotas en la mutación y en la presencia del transgén (líneas *drr1XLox2:gus* y *Atnoa1XLox2:gus*).

7. RESULTADOS.

7.1. El ácido jasmónico inhibe el crecimiento de la raíz primaria e induce la formación de raíces laterales en *A. thaliana*.

Si bien se sabe que los jasmonatos participan en la regulación de la arquitectura radicular de *Arabidopsis* (Staswick *et al.*, 1992; Sun *et al.*, 2009) se desconocen los mecanismos celulares, fisiológicos y moleculares por lo que esto ocurre. Para determinar la concentración mínima a la cual el AJ inhibe el crecimiento de la raíz primaria y promueve la formación de raíces laterales, plántulas silvestres de *Arabidopsis* (Col-0) se germinaron y crecieron con diferentes concentraciones de AJ que van desde 0.25 hasta 16 μM . El AJ disminuyó la longitud de la raíz primaria de manera dependiente de la concentración, alcanzando el máximo efecto represor a partir de 4 μM (Fig. 7A, D). También se observó que el AJ estimula la formación de raíces laterales (Fig. 7B, C y D). Con base en estos resultados, se seleccionaron dos concentraciones de AJ para análisis más detallados, 1 μM ya que a esta concentración se inhibe el 50% de la longitud de la raíz primaria y aumenta tres veces el número de raíces laterales comparada con el control y 4 μM debido a que a esta concentración se observa el efecto inhibitorio máximo en la longitud de la raíz primaria.

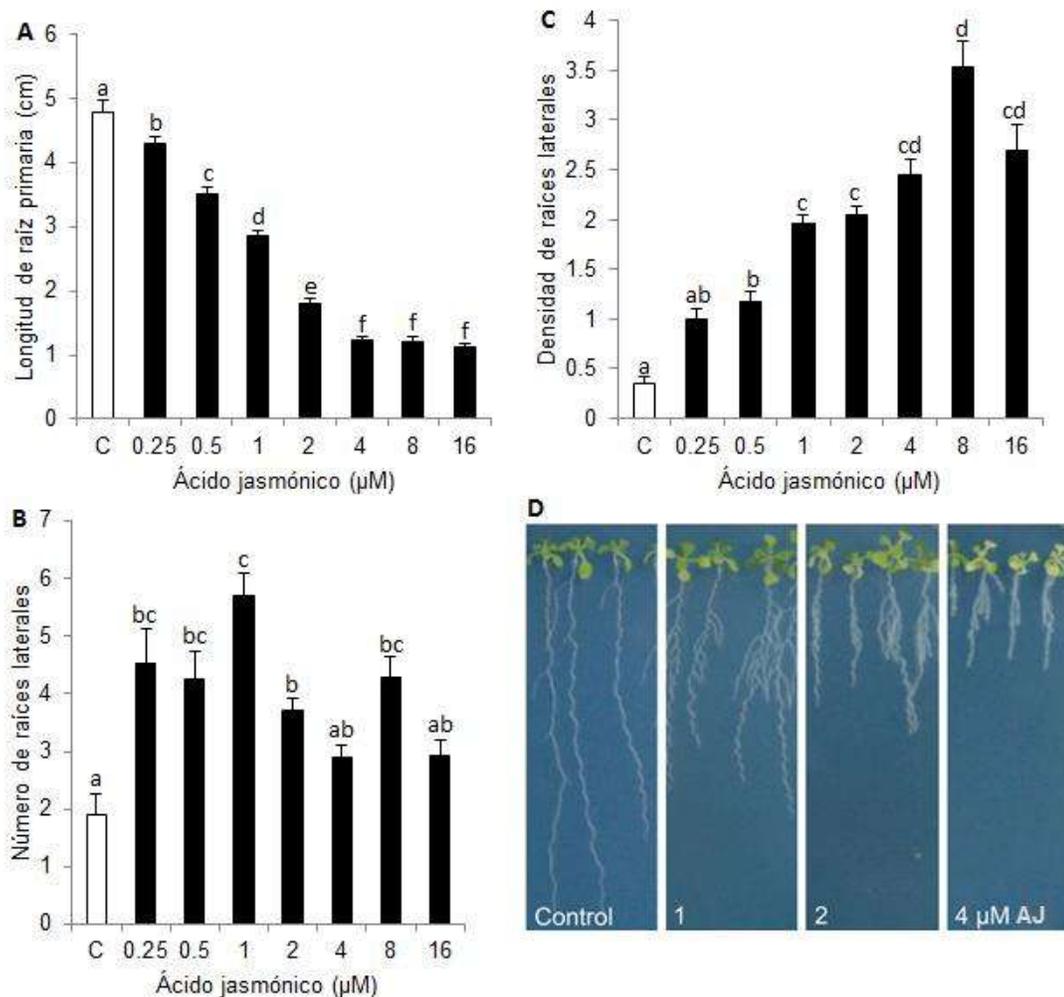


Figura 7. Efecto del AJ sobre la arquitectura radicular de *A. thaliana*. Semillas de plantas silvestres (Col-0) se germinaron y crecieron en medio con el solvente (control) y con concentraciones crecientes de AJ. Diez días después de la germinación se determinó la longitud de la raíz primaria (A), el número de raíces laterales (B) y la densidad de raíces laterales (número de raíces laterales por cm) (C). (D) Imágenes representativas del efecto del AJ en placa. Los valores mostrados en A, B y C representan la media de 30 plantas \pm error estándar. Letras diferentes se utilizan para denotar las medias que son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$), prueba de Tukey. Las fotografías mostradas en D son representativas de al menos tres placas analizadas.

7.2. La mutante deficiente en ON, *Atnoa1*, mostró resistencia en la formación de raíces laterales inducida por AJ, mientras que la doble mutante *nia1 nia2*, se comporta de manera similar que el control.

Actualmente se cuenta con mutantes de *Arabidopsis thaliana* afectadas en la síntesis y señalización de ON. Para determinar la participación de genes asociados a la vía del ON en respuesta al AJ, se analizó el sistema radicular de

las plántulas silvestres (Col-0), la doble mutante *nia1 nia2* y la mutante sencilla *Atnoa1* crecidas en medios suplementados con concentraciones de 1 y 4 μM de AJ. El crecimiento de la raíz primaria fue inhibido en las dos líneas de manera similar a lo observado en las plántulas silvestres (Fig. 8A y C). Sin embargo, en la inducción de raíces laterales, la mutante *Atnoa1* mostró resistencia al efecto del AJ, aunque se observa un aumento, no se compara con las plantas silvestres. Por otro lado se observa que la doble mutante *nia1 nia2* se comportó de manera similar a la silvestre (Fig. 8B y C). Esto indica que el locus *AtNOA1* no participa en la disminución de la longitud de la raíz primaria, pero sí parcialmente en la formación de raíces laterales inducida por AJ.

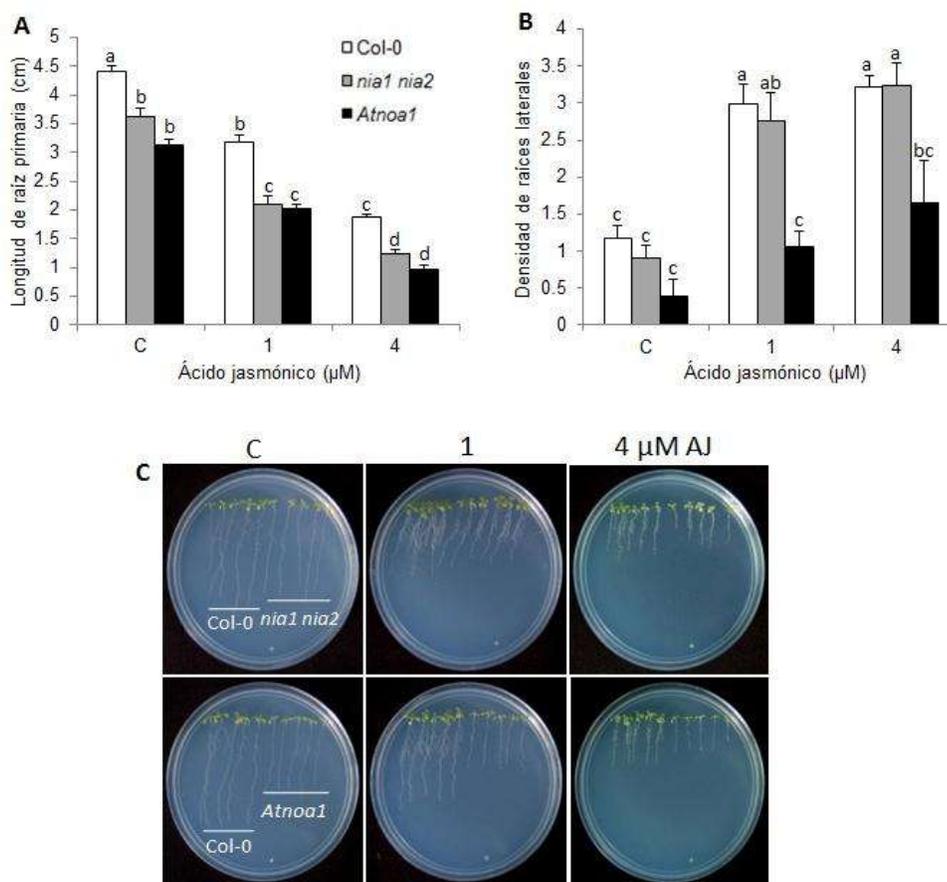


Figura 8. Efecto del AJ sobre la arquitectura radicular de plantas deficientes en ON. Semillas de plantas silvestres (Col-0) y las mutantes *nia1 nia2* y *Atnoa1* se germinaron y crecieron en medio con el solvente (control), con 1 y 4 μM de AJ (n=15 plantas). Diez días después de la germinación se determinó la longitud de la raíz primaria (A), el número de raíces laterales y densidad de raíces laterales (B). Letras diferentes se utilizan para denotar las medias que son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$), prueba de Tukey. (C) Imágenes representativas del efecto del AJ en placa.

7.3. La mutante resistente a alcaloides *drr1*, mostró resistencia en la formación de raíces laterales inducida por AJ.

Debido a los antecedentes que indican que la mutante resistente a alcaloides *drr1*, presenta una resistencia parcial a los efectos del óxido nítrico sobre el desarrollo de raíces laterales, la senescencia y la arquitectura de la raíz en concentraciones elevadas de AJ (Méndez-Bravo *et al.*, 2010; Morquecho-Contreras *et al.*, 2010), procedimos a determinar si DRR1 participa en la vía de señalización del AJ para la regulación de la arquitectura radicular. Para determinar si la mutante *drr1* presentaba resistencia al AJ, plántulas silvestres de *Arabidopsis* (Ws) y de la mutante *drr1*, se germinaron y crecieron en medio con el solvente (control) y en medios suplementados con 1 y 4 μM de AJ. El crecimiento de la raíz primaria fue inhibido tanto en la línea silvestre como en la mutante (Fig. 9A y C). Sin embargo, en el proceso de formación de raíces laterales inducida por AJ se observó claramente que la mutante *drr1* es resistente a los efectos del AJ (Fig. 9B y C), lo cual indica que el gen *DRR1* participa en la respuesta al AJ para la formación de raíces laterales, no siendo así para la disminución de la longitud de la raíz primaria en *A. thaliana*. Sin embargo, se destaca que el efecto de resistencia en la mutante *drr1* es mayor que en la mutante *Atnoa1*, los antecedentes señalan a AtNOA1 como una GTPasa involucrada en el ensamblaje del ribosoma para la correcta síntesis de proteínas (Moreau *et al.*, 2008), por lo tanto sugerimos que la mutación en este gen puede afectar proteínas involucradas en respuesta al AJ para la formación de raíces laterales, tales como las proteínas transportadoras de auxinas PIN1 y PIN2. Aunque hasta la fecha se desconoce la identidad del gen *DRR1*, se sabe que participa en diversas vías como en respuesta a alcaloides, ácido jasmónico y óxido nítrico (Méndez-Bravo *et al.*, 2010; Morquecho-Contreras *et al.*, 2010), lo que sugiere que puede ser un regulador para la expresión de genes en distintas vías y en respuesta a ciertos estímulos y probablemente la mutación en este gen puede afectar la expresión de *AtNOA1* y por lo tanto muestra el fenotipo de mayor resistencia a la formación de raíces laterales en respuesta a AJ.

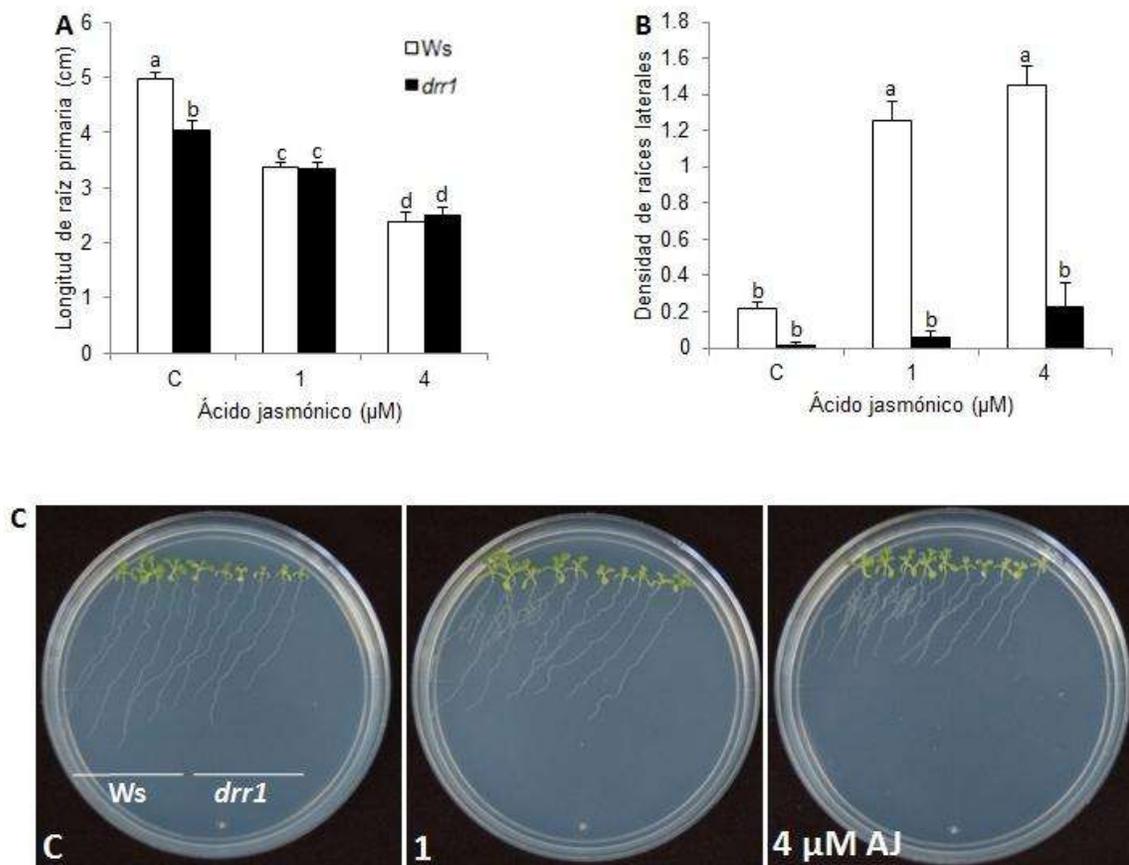


Figura 9. Efecto del AJ sobre la mutante resistente a alcaloides *drr1*. Semillas de plantas silvestres (Ws) y las mutantes *drr1* se germinaron y crecieron en medio con el solvente (control), con 1 y 4 µM de AJ (n=15 plantas). Diez días después de la germinación se determinó la longitud de la raíz primaria (A), el número de raíces laterales y densidad de raíces laterales (B). Letras diferentes se utilizan para denotar las medias que son estadísticamente diferentes (P<0.05), prueba de Tukey. (C) Imágenes representativas de al menos 15 plántulas analizadas.

7.4. La mutante *coronatine insensitive 1 (coi1-1)*, es insensible a los efectos del AJ en la regulación de la arquitectura de la raíz.

La mutante *coi1-1* fue aislada por su insensibilidad a la toxina bacteriana coronatina y al efecto de disminución de la longitud de la raíz primaria mediado por MeJA (Feys *et al.*, 1994). Estudios recientes señalan como principal ligando del receptor a la forma conjugada JA-Ile del estereoisómero específico (+)-7-iso-JA-L-Ile (Fonseca *et al.*, 2009). Por lo tanto, para determinar si el AJ produce su efecto sobre la arquitectura radicular de *Arabidopsis* a través del receptor COI1, semillas de plantas silvestres (Col-0) se germinaron y crecieron en medio MS 0.2X y semillas de la mutante *coi1-1* en medio con 4 µM de AJ para su selección. Cuatro

días después de la germinación, las plántulas se transfirieron a medios con el solvente (control) con 4 μ M de AJ. Seis días después de la transferencia se analizó la longitud de la raíz primaria, donde se observó que la mutante *coi1-1* es insensible a la disminución provocada por el AJ en las plantas silvestres (Fig. 10A y C). De igual manera la mutante *coi1-1* es insensible a la formación de raíces laterales inducidas por AJ (Fig. 10B y C). Además de sugerir que los efectos del AJ sobre la regulación de la arquitectura radicular son a través del receptor COI1, este ensayo sirvió para seleccionar las plantas mutantes para estudios adicionales.

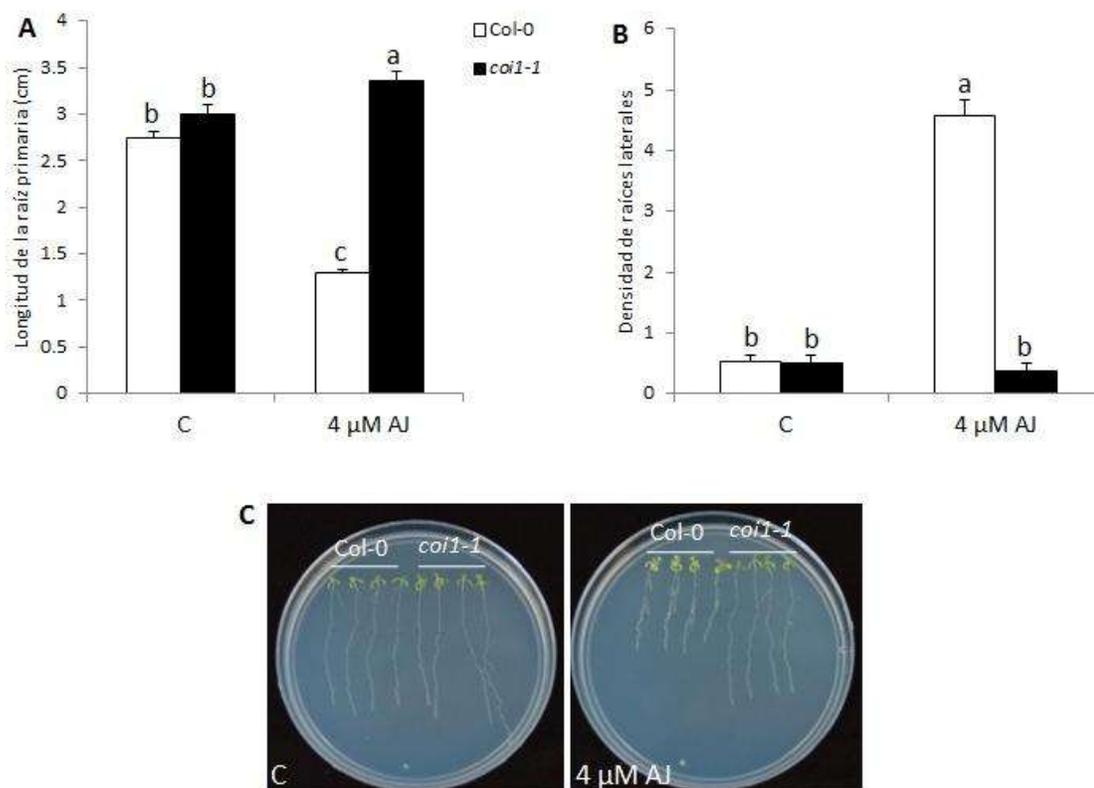


Figura 10. Efecto del AJ sobre la mutante *coi1-1*. Semillas de plantas silvestres (Col-0) y las mutantes *coi1-1* se germinaron y crecieron en medio MS 0.2x y con 4 μ M de AJ. Cuatro días después de la germinación las plantas se transfirieron a medio con el solvente (control) y con 1 y 4 μ M de AJ. Seis días después de la transferencia se determinó la longitud de la raíz primaria (A), el número de raíces laterales y densidad de raíces laterales (B). Letras diferentes se utilizan para denotar las medias que son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$), prueba de Tukey. (C) Imágenes representativas de al menos 3 placas analizadas.

7.5. La mutante *coi1-1* no es resistente a los efectos del donador de ON, SNP, sobre el desarrollo de la raíz.

Para determinar una posible participación del AJ a través del receptor COI1 sobre la regulación de la arquitectura radicular mediada por ON, plántulas silvestres (Col-0) germinadas y crecidas en medios MS 0.2x y la mutante *coi1-1* previamente seleccionadas mediante germinación y crecimiento en 4 μ M de AJ, fueron transferidas a medios control que contenían el solvente o tratamientos con el donador de ON, SNP, a las concentraciones de 10, 20 y 30 μ M, descritas previamente por su efecto sobre la arquitectura radicular de *A. thaliana* (Méndez-Bravo *et al.*, 2010). Posteriormente, seis días después de la transferencia se analizó el efecto del SNP sobre la longitud de la raíz primaria (Fig. 11A y C) y la formación de raíces laterales (Fig. 11B y C) y se observó que la mutante *coi1-1* es sensible a los efectos provocados por el ON de manera similar que su parental silvestre. Lo anterior indica que COI1 no participa en la regulación de la arquitectura radicular en respuesta a ON.

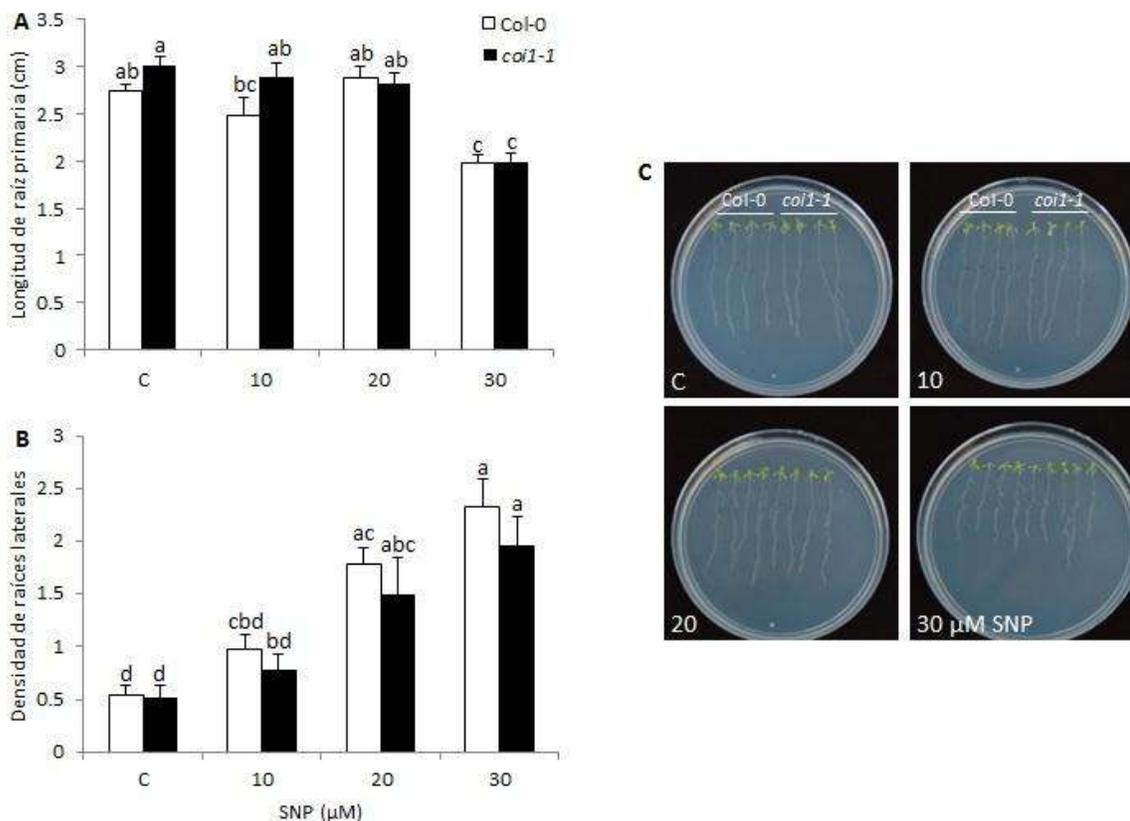


Figura 11. Efecto del SNP sobre la mutante *coi1-1*. Semillas de plantas silvestres (Col-0) y las mutante *coi1-1* se germinaron y crecieron en medio MS 0.2x y con 4 μM de AJ. Cuatro días después de la germinación las plantas fueron transferidas a medio con el solvente (control) o suplementadas con 10, 20 y 30 μM de SNP y 6 días después de la transferencia se determinó la longitud de la raíz primaria (A), el número de raíces laterales y densidad de raíces laterales (B). Letras diferentes se utilizan para denotar las medias que son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$), prueba de Tukey. (C) Fotografías representativas de al menos 15 plantas analizadas.

7.6. Las mutantes resistentes al AJ, *jar1-1* y *axr1-3*, no presentan resistencia a los efectos producidos por el SNP.

Para investigar si los elementos de síntesis y de percepción de jasmonatos JAR1 y AXR1-3 participan en la regulación de la arquitectura de la raíz en respuesta a ON, semillas de las plantas silvestres (Col-0) y las mutantes *jar1-1* y *axr1-3* se germinaron y crecieron en medio adicionado con el solvente (control) y con tratamientos de 10, 20 y 30 μM del donador de ON SNP. Se observó que ambas mutantes son sensibles a los efectos de la disminución de la longitud de la raíz primaria mediados por SNP (Fig. 12A y C) y además, las dos mutantes aumentan el número de raíces laterales de manera similar a las plantas silvestres

en respuesta al SNP (Fig. 12B y C), lo que sugiere que los elementos JAR1 y AXR1-3 no participan en respuesta al ON en la regulación de la arquitectura radicular de *Arabidopsis*.

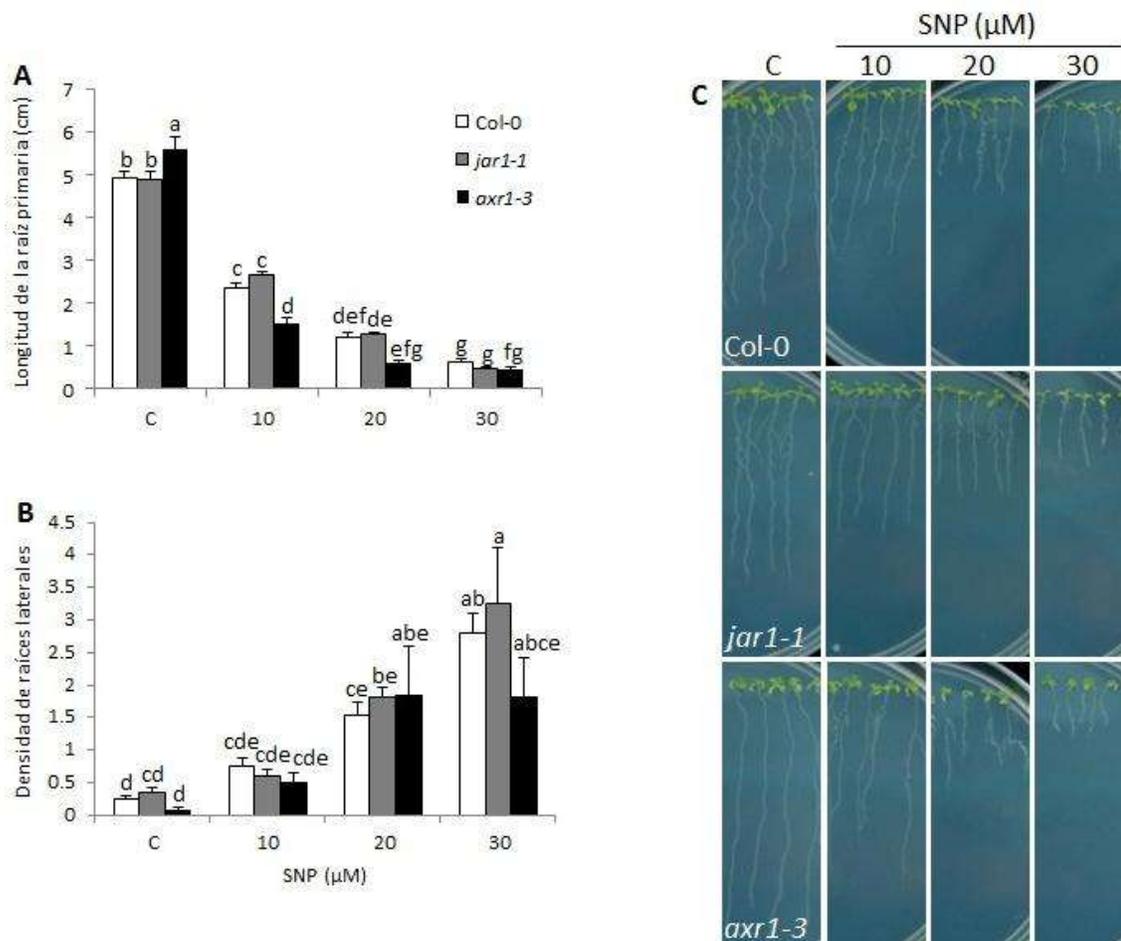


Figura 12. Efecto del SNP sobre la arquitectura de la raíz de mutantes afectadas en síntesis y percepción de jasmonatos. Semillas de plantas silvestres (Col-0) y las mutantes *jar1-1* y *axr1-3* se germinaron y crecieron en medios con el solvente (control), o suplementados con 10, 20 y 30 µM de SNP. Diez días después de la germinación se determinó la longitud de la raíz primaria (A), el número de raíces laterales y densidad de raíces laterales (B). Letras diferentes se utilizan para denotar las medias que son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$), prueba de Tukey. Las imágenes mostradas son representativas de al menos 15 plantas analizadas (C).

7.7. El SNP induce un aumento en los niveles de ON en los tejidos de la raíz de *Arabidopsis* y promueve procesos de diferenciación.

El óxido nítrico es una molécula de señalización involucrada en diversos procesos del desarrollo. Estudios recientes determinaron que dicha molécula participa en la diferenciación de tricoblastos y de pelos radiculares, así como de

las células de la cofia (Méndez-Bravo *et al.*, 2010). Para determinar con mayor precisión los tejidos específicos en los cuales el ON incrementa sus niveles en respuesta al SNP, semillas de plantas silvestres Col-0 se germinaron y crecieron en medio control y con 10, 20 y 30 μM de SNP. Para detectar los niveles de ON, se utilizó el fluorocromo DAF-2DA, el cual se difunde libremente a través de la membrana celular y posteriormente se une de manera específica al ON, formando un compuesto fluorescente, donde la intensidad de la fluorescencia será directamente proporcional a los niveles de ON (Kojima *et al.*, 1998). Por medio de microscopía confocal, se observaron imágenes en un plano de corte transversal en el que claramente se aprecian los tejidos distintivos de la raíz. El ON se localizó en células de la cofia (punta de la raíz) (Fig.13A, flecha verde), en una porción de células epidérmicas en la zona de elongación (Fig. 13A, flecha blanca) y en células diferenciadas que corresponden a tricoblastos y pelos radiculares en la zona de diferenciación (Fig. 13A, flecha azul). Interesantemente se detectó un patrón de células en la parte central de la raíz que corresponden a las células iniciales del córtex y la endodermis (Fig. 13A, flecha roja), que posiblemente estén involucradas en la diferenciación (Fernández-Marcos *et al.*, 2011) (Fig. 13A). Cuando las plantas fueron tratadas con distintas concentraciones de SNP, se observó que este induce un incremento en los niveles de ON de manera dependiente de la concentración (Fig. 13C) en las zonas de las células de la cofia, córtex, endodermis y en células epidérmicas, las cuales claramente se muestran diferenciadas en pelos radiculares. Además, se aprecia una clara acumulación de ON en la zona citoplásmica de las células en las que se difunde, mientras que en la pared celular y el núcleo se observa ausencia de él, lo que sugiere que el ON se acumula específicamente en algunos tejidos (Fig. 13B). Además, la disminución de la longitud de la raíz primaria se debe al acortamiento de la zona de elongación que da paso a la rápida diferenciación de células, sugiriendo que el ON participa como molécula de señalización en la activación del proceso de diferenciación celular.

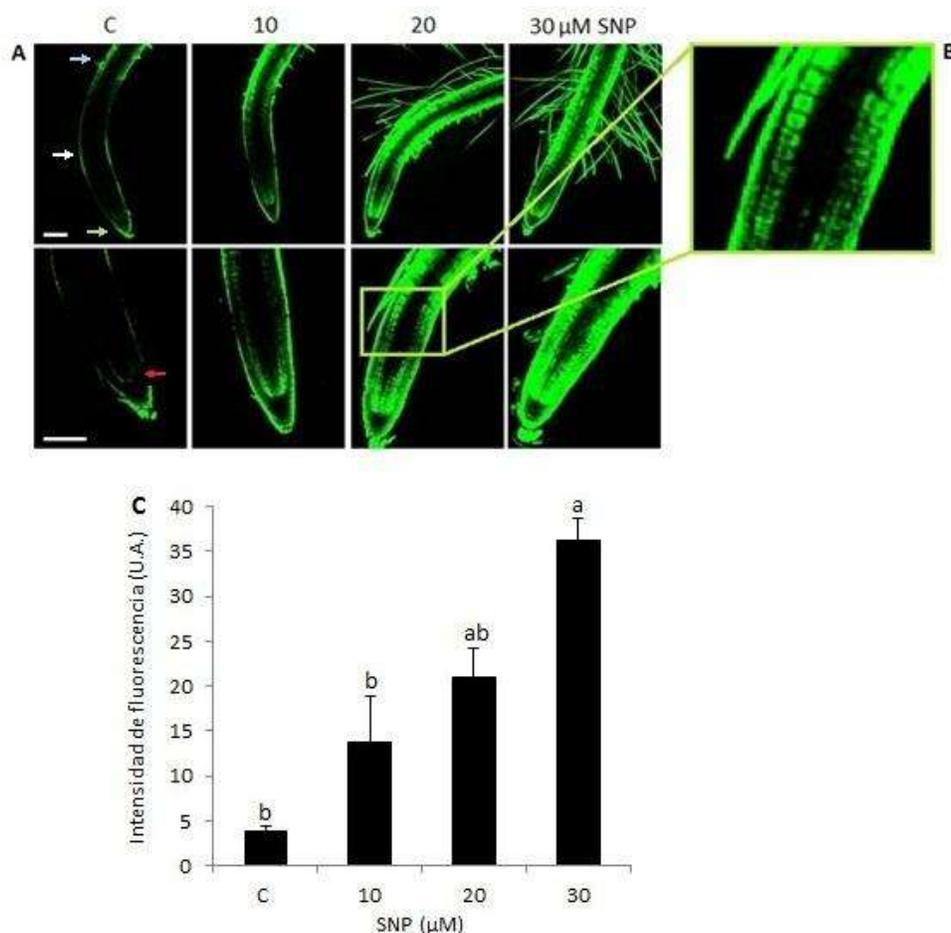


Figura 13. Niveles del ON en respuesta al SNP en la raíz de *Arabidopsis*. Semillas de plantas silvestres (Col-0) se germinaron y crecieron en medios con el solvente (control) y con tratamientos del donador de óxido nítrico SNP en concentraciones de 10, 20 y 30 μM. Ocho días después de la germinación se realizó un análisis de los niveles endógenos de ON por microscopía confocal en la raíz primaria. (A) Imágenes representativas de al menos 10 plantas analizadas. (C) Cuantificación de la fluorescencia emitida por el DAF-2T en las puntas de las raíces observadas con en el aumento 10X. La flecha verde indica la zona de la cofia, la blanca, la zona de elongación, la azul, zona de diferenciación y la roja las células iniciales del córtex y la endodermis. La escala de la gráfica está expresada en unidades arbitrarias. Letras diferentes representan medias estadísticamente significativas ($P < 0.05$), prueba de Tukey.

7.8. El AJ induce un incremento en los niveles de ON endógeno lo que lleva a la activación de procesos de diferenciación.

Para determinar el efecto del AJ sobre la acumulación del ON, semillas de plantas silvestres (Col-0) se germinaron y crecieron en medios control y suplementados con 1, 4 y 8 μM de AJ. Posteriormente, se analizaron los niveles de ON por microscopía confocal. En la figura 14 se observa que las plantas tratadas con las distintas concentraciones de AJ muestran un aumento en los

niveles de ON endógeno, de manera dependiente de la concentración. Además, se muestra que el ON se incrementa en zonas específicas de la raíz como la cofia, filas celulares del córtex y endodermis y en células epidérmicas diferenciadas, mostrando el mismo patrón que en células tratadas con el donador de ON, SNP. Asimismo, se muestra que el acortamiento de la longitud de la raíz primaria se debe a la disminución de la zona de elongación, seguido del comienzo de la zona de diferenciación evidenciado por la aparición de los pelos radiculares. Esto sugiere que el ON es un mediador celular para los procesos de diferenciación celular en respuesta al AJ en la raíz de *A. thaliana*.

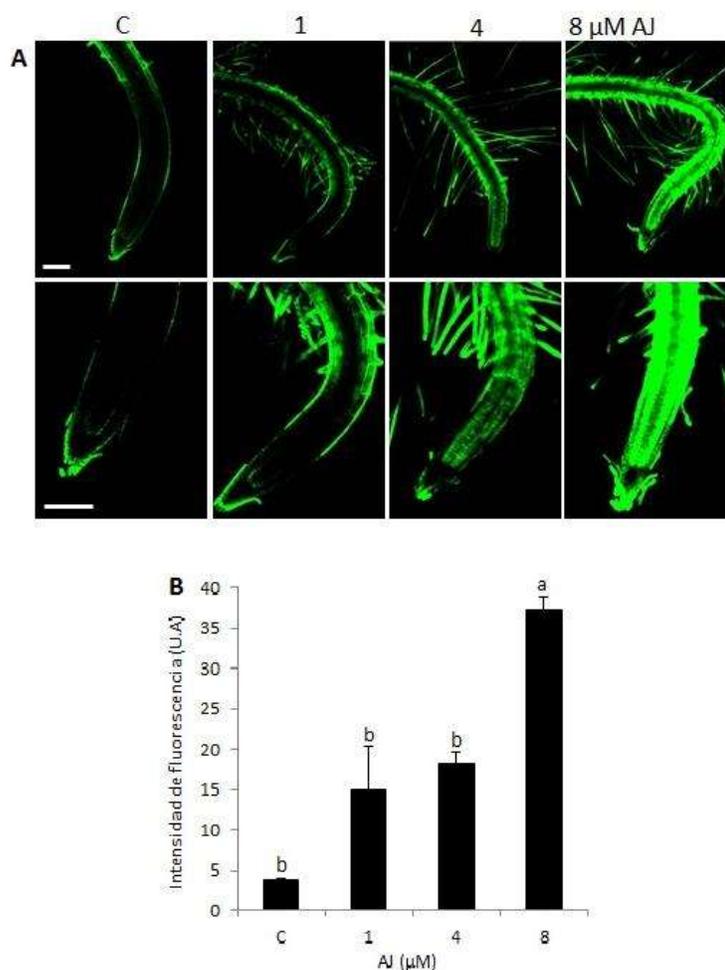


Figura 14. Efecto del AJ sobre los niveles de ON en *A. thaliana*. Semillas de plantas silvestres (Col-0) se germinaron y crecieron en medios con el solvente (control) y suplementados con 1, 4 y 8 de AJ μM. Ocho días después de la germinación se realizó un análisis de los niveles endógenos de ON por microscopía confocal en la punta de la raíz primaria. (A) Imágenes representativas de al menos 10 plantas analizadas. (B) Cuantificación de la fluorescencia en las raíces. La escala de la gráfica está expresada en unidades arbitrarias. Letras diferentes representan medias estadísticamente significativas ($P < 0.05$), prueba de Tukey.

7.9. La mutante asociada al ON, *Atnoa1*, es sensible al aumento en los niveles de ON en respuesta al AJ.

Debido a la resistencia mostrada por la mutante *Atnoa1* en la formación de raíces laterales inducida por AJ, se determinaron los niveles de ON en respuesta a AJ en las distintas zonas de la raíz. Las plantas previamente tratadas con distintas concentraciones de AJ, se analizaron en una imagen en un plano de corte longitudinal y se observó que en condiciones control, las mutantes *Atnoa1* presentan niveles similares de ON que las plantas silvestres, lo que muestra que en esta zona específica de la raíz que se analizó, no hay una deficiencia de ON. Sin embargo, se aprecia que el comportamiento de las plantas mutantes no es igual que la silvestre, ya que en zonas como la cofia se observan diferencias en los niveles de ON, aunque no es significativo. En los tratamientos en respuesta a AJ, se observó un aumento en los niveles de ON de manera dependiente de la concentración (Fig. 15) tanto en la mutante como en las plantas silvestres. Lo que sugiere que *AtNOA1* no está afectada en la síntesis de ON, sino que es un elemento de señalización en respuesta al AJ.

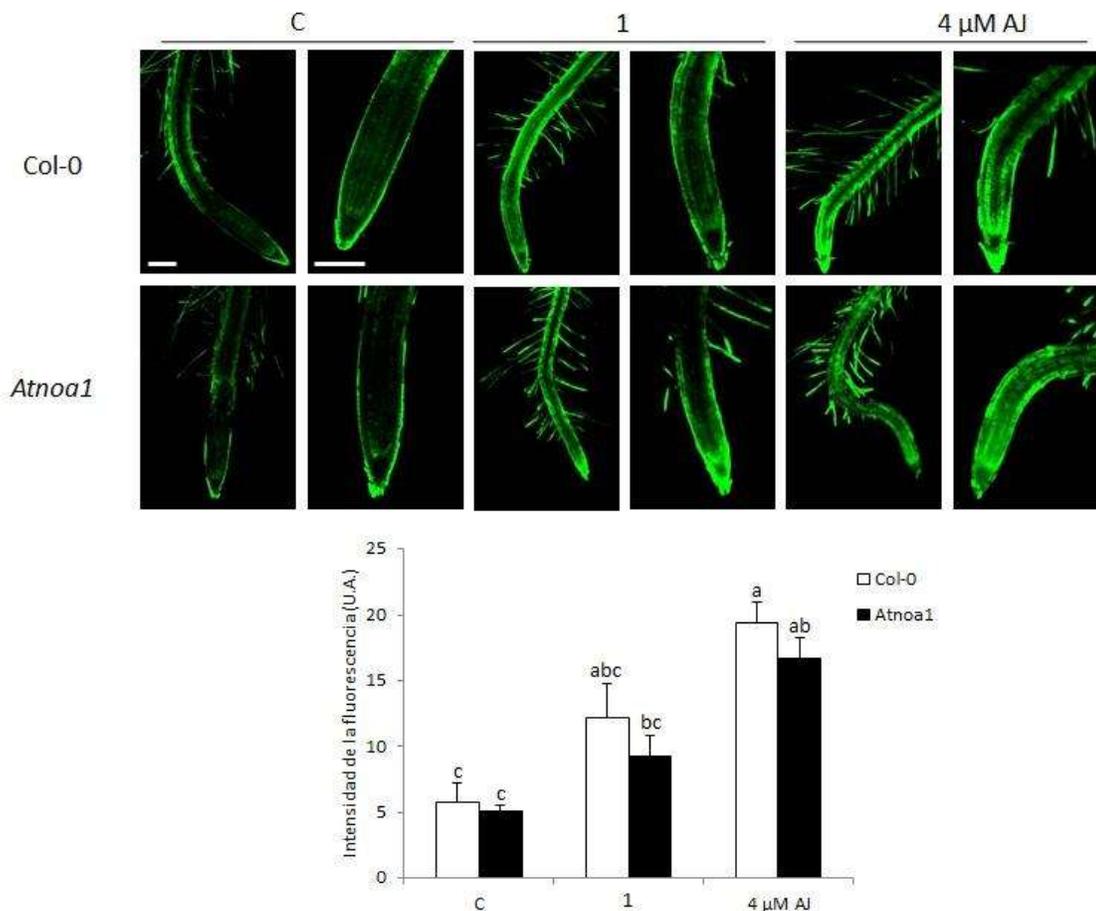


Figura 15. Efecto del AJ sobre los niveles de ON de plantas silvestres (Col-0) y la mutante *Atnoa1*. Semillas de plantas silvestres (Col-0) y de la mutante *Atnoa1* se germinaron y crecieron en medios con el solvente (control) y suplementados con AJ en concentraciones de 1 y 4 μM. Ocho días después de la germinación se realizó un análisis de los niveles endógenos de ON por microscopía confocal en la punta de la raíz primaria. (A) Imágenes representativas de al menos 10 plantas analizadas. (B) Cuantificación de la fluorescencia en las raíces. La escala de la gráfica está expresada en unidades arbitrarias. Letras diferentes representan medias estadísticamente significativas ($P < 0.05$), prueba de Tukey.

7. 10. La mutante insensible *coi1-1* es resistente al incremento de los niveles de ON en respuesta al AJ.

Para evaluar si los efectos del AJ sobre los niveles de ON dependen de la vía del receptor de jasmonatos COI1, se determinaron los niveles de ON por microscopía confocal en plantas silvestres y mutantes *coi1-1*, previamente seleccionadas con AJ. Se observó que en condiciones control las plantas silvestres presentan niveles basales de ON, en la zona de formación de pelos radiculares, mientras que en tratamiento con 4 μM de AJ, se induce un incremento

en los niveles de ON en las zonas de la cofia, córtex, endodermis y epidermis. Interesantemente, en la mutante *coi1-1*, no se incrementaron los niveles endógenos de ON (Fig. 16), lo que sugiere que la modulación de la arquitectura radicular mediada por ON en respuesta a AJ ocurre vía el receptor COI1.

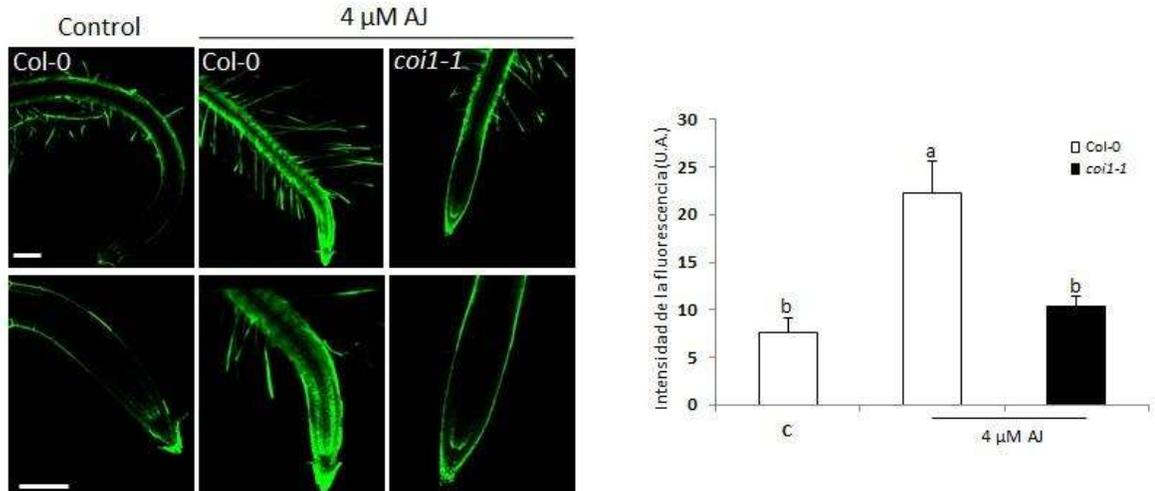


Figura 16. Efecto del AJ sobre los niveles de ON de plantas silvestres (Col-0) y la mutante *coi1-1*. Semillas de plantas silvestres (Col-0) y de la mutante *coi1-1* se germinaron y crecieron en medios con el solvente (control) y con 4 μM de AJ. Ocho días después de la germinación se realizó un análisis de los niveles endógenos de ON por microscopía confocal en la punta de la raíz primaria. (A) Imágenes representativas de al menos 10 plantas analizadas. (B) Cuantificación de la fluorescencia en las raíces. La escala de la gráfica está expresada en unidades arbitrarias. Letras diferentes representan medias estadísticamente significativas ($P < 0.05$), prueba de Tukey.

7.11. El AJ y el SNP inducen la expresión del gen *LOX2* de respuesta temprana a AJ.

Además de evaluar a nivel morfológico los efectos del ON sobre elementos de la vía del AJ y viceversa, también se analizó a nivel molecular el patrón de expresión del gen *LOX2* inducible por AJ. Este gen codifica para la lipoxigenasa que participa en la síntesis de jasmonatos en *Arabidopsis* (Avanci *et al.*, 2010). Semillas de la línea transgénica *LOX2:GUS* se crecieron y germinaron en medios con el solvente (control) y suplementados con AJ y SNP, posteriormente, se procesaron para determinar la actividad de la enzima β-glucoronidasa. En la figura 17 se observa la expresión que ocurre en las hojas y en los primordios de las hojas en condiciones control. Conforme las plantas son tratadas con distintas

concentraciones de AJ, la expresión del gen aumenta de manera dependiente de la concentración. Cuando se analizaron los niveles de expresión del marcador en respuesta al SNP, se observó que este tiene la capacidad de incrementar de manera dependiente de la concentración la expresión del gen, aunque en menor proporción que el AJ. Lo anterior sugeriría que el ON regula de manera parcial la expresión del gen *LOX2* de respuesta temprana a AJ.

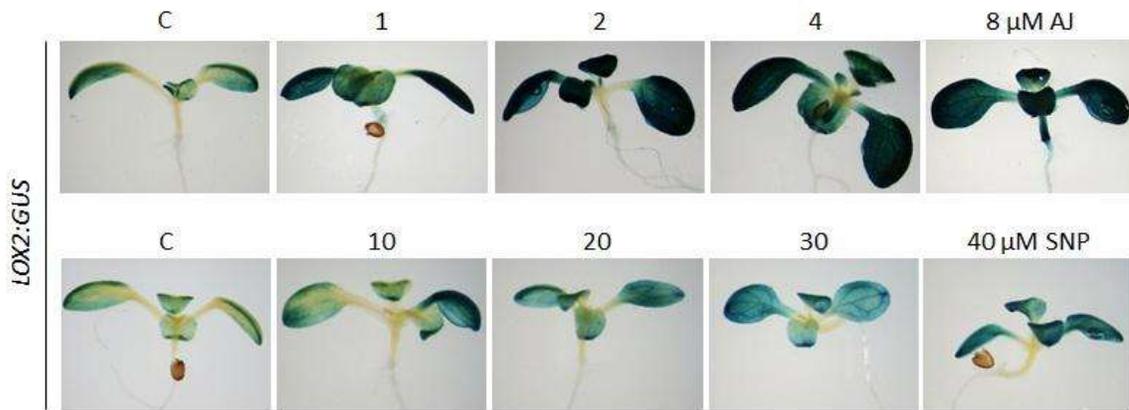


Figura 17. Efecto comparativo del AJ y SNP sobre la expresión del gen *LOX2* de respuesta a AJ. Semillas de la línea transgénica *LOX2:GUS* se germinaron y crecieron en medios control y con tratamientos de AJ y SNP, siete días después se observó la expresión del marcador mediante un análisis histoquímico. Las fotografías son representativas de al menos 15 plántulas.

7.12. *AtNOA1* y *DRR1* regulan de manera positiva la expresión del gen *LOX2* inducible por AJ.

Una vez determinado que el ON regula la expresión del gen *LOX2* inducible por AJ, se investigó si los genes *AtNOA1* y *DRR1* podrían participar en la modulación de la expresión del gen en respuesta al AJ. Se realizaron cruzas entre la línea transgénica y las mutantes *Atnoa1* y *drr1*; después de haber obtenido las plantas homocigas que expresan el marcador, se crecieron en medios con el solvente (control) y en tratamientos con 4 μ M de AJ (concentración óptima para observar el aumento en la expresión del marcador). Posteriormente, se procesaron para evaluar la actividad de GUS. En condiciones control, la cruce entre la mutante *Atnoa1/LOX2:GUS* mostró una expresión del marcador casi nula, mientras que la cruce entre la mutante *drr1/ LOX2:GUS* mostró niveles

disminuidos de la expresión del gen. Cuando ambas líneas fueron tratadas con AJ, la mutante *Atnoa1* aumentó los niveles de expresión del marcador, sin llegar a los de la planta control. Por otro lado, la mutante *drr1*, mostró niveles de expresión disminuidos comparados con la silvestre y con la otra mutante (Fig. 18). Estos resultados sugieren que AtNOA1 y DRR1 son elementos de regulación positiva del gen de respuesta temprana a AJ, *LOX2*.

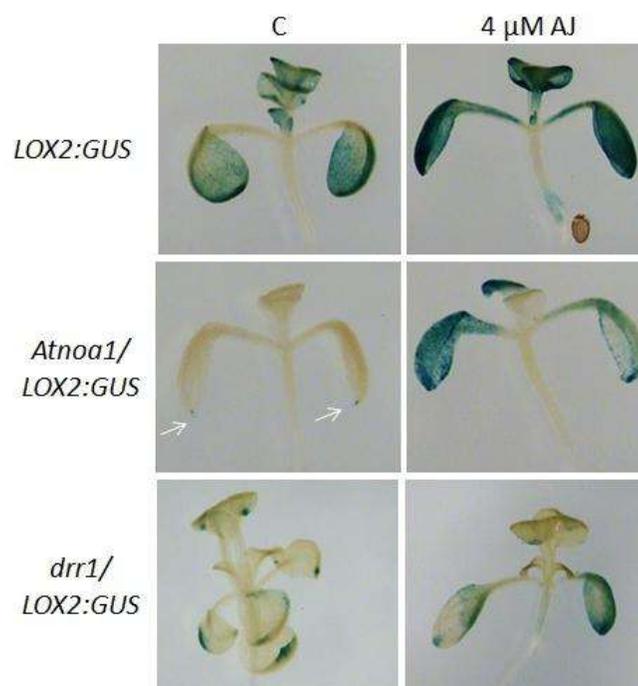


Figura 18. Expresión del gen *LOX2* de respuesta a AJ en las mutantes *Atnoa1* y *drr1*. Semillas de plantas de la cruza entre las mutantes y la línea transgénica *LOX2:GUS* se germinaron y se crecieron en medios control y con tratamientos de 4 μ M de AJ. A los siete días después de la germinación se observó la expresión del marcador mediante un análisis histoquímico. Las fotografías son representativas de al menos 15 plántulas.

8. DISCUSIÓN.

La arquitectura de las plantas es un determinante para adaptarse al medio ambiente. Aunque el desarrollo de la raíz está dirigido por mecanismos genéticos, su configuración final está dada por factores bióticos y abióticos (López-Bucio *et al.*, 2003; Gray, 2004). La arquitectura radicular puede ser modificada por los reguladores del crecimiento, tales como las auxinas, citocininas y etileno (López-Bucio *et al.*, 2003). Con el reciente reconocimiento de diversas moléculas como fitohormonas, el estudio sobre su participación en la regulación de la arquitectura de la raíz ha sido de gran interés. El ácido jasmónico es una fitohormona descrita principalmente por su participación en respuestas a estrés biótico y abiótico y en distintos procesos del desarrollo como la reproducción (Browse, 2009). Si bien, se sabe que dicha fitohormona regula la arquitectura radicular (Staswick *et al.*, 1992; Sun *et al.*, 2009), se desconocen los mecanismos moleculares por los que actúa sobre este proceso. El óxido nítrico es una molécula señalizadora que está involucrado en procesos fisiológicos como la muerte celular programada, la defensa, el cierre de estomas, la regulación de la expresión de genes y la regulación de la arquitectura radicular (Neill *et al.*, 2002; Orozco-Cárdenas y Ryan, 2002, Correa-Aragunde *et al.*, 2006; Campos-Cuevas *et al.*, 2008). Algunos estudios han determinado que el ON interviene en la respuesta del AJ al estrés por heridas (Huang *et al.*, 2004). Sin embargo, se desconocen las posibles interacciones entre el AJ y el ON en la regulación de la arquitectura de la raíz.

En este trabajo, se investigó la interacción entre las vías del AJ y el ON durante la regulación de la arquitectura radicular, mediante herramientas genéticas y el uso del indicador fluorescente DAF-2DA (fluorocromo que se une de manera específica al ON), que permite revelar la localización y concentración del ON (Kojima *et al.*, 1998). Diversos estudios han hecho uso del derivado del AJ, MeJA para determinar su participación sobre el desarrollo de la raíz (Staswick *et al.*, 1992; Sun *et al.*, 2009) sin embargo, no se habían determinado las concentraciones mínimas activas del AJ. En nuestros experimentos, se encontró que a partir de concentraciones de 0.25 hasta 16 μ M disminuyen la longitud de la

raíz primaria y aumentan el número de raíces laterales en plantas silvestres (Fig. 7).

Para estudiar la vía de señalización del ON dependiente de nitrito se utilizaron las mutantes afectada en síntesis *nia1 nia2*, carente de las dos nitrato reductasas de *Arabidopsis*, y la mutante asociada a ON *Atnoa1*, la cual está afectada en una cGTPasa que participa en el ensamble del ribosoma en cloroplastos y mitocondrias para la correcta síntesis de proteínas (Moreau *et al.*, 2008) y la mutante resistente a alcaloides *drr1*, la cual se determinó en estudios previos que participa en procesos relacionados con el ON (Méndez-Bravo *et al.*, 2010). Debido a la resistencia mostrada de las mutantes *Atnoa1* y *drr1* en la formación de raíces laterales inducida por AJ (Fig. 8 y 9), nuestros resultados sugieren que AtNOA1 y DRR1 podrían participar en la formación de raíces laterales en respuesta a AJ, no siendo así para la disminución de la longitud de la raíz primaria. Según la función de AtNOA1 sugerimos que la mutación en este gen puede afectar proteínas involucradas en respuesta al AJ para la formación de raíces laterales, tales como las proteínas transportadoras de auxinas PIN1 y PIN2 (Sun *et al.*, 2009). Aunque hasta la fecha se desconoce la identidad del gen *DRR1*, se sabe que participa en diversas vías como en respuesta a alcaloides, ácido jasmónico y óxido nítrico (Méndez-Bravo *et al.*, 2010; Morquecho-Contreras *et al.*, 2010), lo que sugiere que puede ser un regulador para la expresión de genes en distintas vías y en respuesta a ciertos estímulos y probablemente la mutación en este gen puede afectar la expresión de *AtNOA1* y por lo tanto muestra el fenotipo de mayor resistencia a la formación de raíces laterales en respuesta a AJ.

La vía de señalización del AJ depende de la percepción de los jasmonatos por el receptor COI1, el cual provee especificidad a las respuestas de los jasmonatos (Browse, 2009). Se ha observado que las mutantes afectadas en este gen son insensibles a los efectos sobre la disminución de la longitud de la raíz primaria ocasionados por la toxina bacteriana coronatina y por el MeJA (Feys *et al.*, 1994). En esta investigación, en respuesta al AJ, observamos que la mutante *coi1-1* es insensible a los efectos ocasionados en la raíz de plantas silvestres (Fig.

10), lo que sugiere que para regular la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis* el AJ es percibido vía el receptor COI1. Para investigar la participación de COI1 en la regulación de la arquitectura radicular mediada por ON, se trataron plántulas mutantes con distintas concentraciones del donador de ON, SNP, los resultados indican que la mutante *coi1-1* es sensible a los efectos ocasionados por el SNP, lo que sugiere que la regulación de la arquitectura radicular mediada por ON no involucra la participación del receptor nuclear de jasmonatos COI1 (Fig. 11), también evaluamos otros elementos de la vía de síntesis y percepción de jasmonatos en respuesta a ON. La mutante *jar1-1* afectada en el gen que codifica para la enzima que convierte el AJ en JA-Ile y *axr1-3* afectada en el gen que codifica para una proteína involucrada en el complejo de ubiquitinación para la degradación de represores. Plántulas de dichas mutantes se crecieron en tratamientos con SNP, en donde se observó que ninguna de ellas mostró resistencia a los efectos ocasionados por el donador de ON (Fig. 12), lo que sugiere que el ON no implica la participación de JAR1 y AXR1-3 en la regulación de la arquitectura de la raíz en *A. thaliana*.

El óxido nítrico es un mediador celular que participa en diversos procesos del desarrollo. Se ha investigado su participación en procesos de diferenciación de la raíz, lo cual se evidenció por un aumento en los niveles de ON en tricoblastos y en pelos radiculares, así como en células de la cofia (Méndez-Bravo *et al.*, 2010). Para determinar con mayor precisión en los tejidos específicos en los cuales el ON incrementa sus niveles en respuesta al SNP, en este trabajo utilizamos plantas silvestres (Col-0) tratadas con SNP, en las cuales se analizó la localización y concentración de ON. El ON en condiciones control se localiza en células de la cofia (punta de la raíz), una porción de células epidérmicas en la zona de elongación y en células diferenciadas que corresponden a tricoblastos y pelos radiculares en la zona de diferenciación. Además, se observa un patrón de células en la parte central de la raíz que corresponden a las células iniciales del córtex y la endodermis, que posiblemente estén involucradas en la diferenciación (Fig. 13A) (Fernández-Marcos *et al.*, 2011; Fernández-Marcos *et al.*, 2012). En los distintos tratamientos con SNP se encontró que este compuesto induce un incremento en

los niveles de ON de manera dependiente de la concentración (Fig. 13C) en las zonas de la raíz antes descritas y especialmente en células diferenciadas, las cuales claramente se diferencian en pelos radiculares. También, se observa que el ON se concentra en la zona citoplásmica de las células en las que se difunde, mientras que en la pared celular y el núcleo se aprecia ausencia de él, lo que nos sugiere que el ON actúa en sitios específicos de las células de la raíz y sólo se incrementa en ciertos tejidos (Fig. 13B). Asimismo, se determinó que la disminución de la longitud de la raíz primaria se debe al acortamiento de la zona de elongación y al comienzo del proceso de diferenciación, sugiriendo que el ON participa como molécula de señalización para la activación del proceso de diferenciación en células de la raíz de *Arabidopsis*.

Para establecer el efecto del AJ sobre los niveles del ON, se detectó el ON endógeno en plantas silvestres tratadas con AJ por medio de microscopia confocal. Se encontró que las plantas tratadas con AJ incrementan los niveles de ON endógeno, de manera dependiente de la concentración (Fig. 14). Además, se encontró el mismo patrón de localización celular de ON que en plántulas tratadas con el donador de ON SNP y el acortamiento de la zona de elongación. Esto sugiere que el ON es un mediador celular para los procesos de diferenciación celular en respuesta al AJ en la raíz de *A. thaliana*. Sin embargo, la mutante *Atnoa1* mostró niveles de ON similares a las plantas control en respuesta a AJ (Fig. 15). En los antecedentes se señala que debido a la localización de dicho elemento en mitocondrias y cloroplastos que son sitios de transferencia de electrones y pueden llevar a cabo la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), se sugiere que el ensamble defectuoso del ribosoma en la mutante *Atnoa1*, lleva a un incremento en la producción de ERO, debido a que el ON es altamente reactivo, puede reaccionar con el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y con radicales lipídicos y de esta manera disminuir los niveles de ON (Moreau *et al.*, 2008). Por lo tanto, sugerimos que AtNOA1 no está afectada en la síntesis de ON en respuesta al AJ, si no que es un elemento de señalización para la formación de raíces laterales.

Se sabe que la señalización del AJ implica al receptor COI1, por lo tanto, para evaluar si los efectos AJ sobre los niveles de ON dependen de la vía del receptor, se determinaron los niveles de ON por microscopia confocal de plantas silvestres y mutantes *coi1-1*. Interesantemente, la mutante *coi1-1* tratada con AJ, no incrementa sus niveles endógenos de ON (Fig. 16), lo que sugiere que la modulación de la arquitectura radicular mediada por ON en respuesta a AJ es llevada a través del receptor COI1.

El ON se ha implicado como regulador negativo de genes de defensa inducibles por herida en plantas de tomate, lo que sugiere su participación como regulador de la expresión de genes de respuesta a AJ. Para evaluar la participación del ON sobre la expresión del gen *LOX2* de respuesta temprana a AJ, el cual codifica para la principal lipoxigenasa descrita en *Arabidopsis* (Bell y Mullet, 1993), se utilizó la línea transgénica *LOX2:GUS*. Se observó que en plantas tratadas con AJ la expresión del gen aumenta de manera dependiente de la concentración. En respuesta a SNP se observó que la expresión del gen aumenta de manera dependiente de la concentración, aunque no de la misma manera que con el AJ (Fig. 17). Los resultados anteriores sugieren que el ON podría regular de manera parcial la expresión del gen *LOX2* de respuesta temprana a AJ. Además, para investigar si los genes *AtNOA1* y *DRR1* participan en la modulación de la expresión de *LOX2*, se realizaron cruza entre la línea transgénica y cada una de las mutantes y se trataron con AJ. En condiciones control, la cruza entre la mutante *Atnoa1* mostró una expresión del marcador casi nula, mientras que la mutante *drr1* mostró niveles disminuidos de la expresión del gen. En respuesta a AJ, la mutante *Atnoa1* aumenta los niveles de expresión del marcador, sin llegar a los niveles de las plantas control, por otro lado, la mutante *drr1*, mostró niveles muy disminuidos de expresión comparados con el control y con la otra mutante (Fig. 18). Lo antes mencionado sugiere que *AtNOA1* y *DRR1* son elementos de regulación positiva del gen *LOX2* de respuesta temprana a AJ. Esta evidencia genética y morfológica podría sugerir que el ON está participando como regulador de la formación de raíces laterales mediada por AJ y de la expresión del gen *LOX2* de respuesta temprana a AJ. Además, los genes *AtNOA1*

y *DRR1* también estarían involucrados como elementos que regulan de manera positiva la expresión de dicho gen (Fig. 19). El modelo propuesto de acuerdo a los resultados indicaría que el ON actúa cascada abajo de la señalización por AJ dependiente del receptor COI1 y que participaría en tres procesos fisiológicos: la regulación de la actividad del meristemo apical, la activación de células del periciclo y la expresión del gen *LOX2* de respuesta a AJ donde AtNOA1 y DRR1 también participan como elementos de regulación positiva de la expresión de este gen. Se sabe que la regulación de la arquitectura radicular en *Arabidopsis* es un complejo sistema de adaptación, integración e interacción de señales ambientales y genéticas. La importancia de las fitohormonas en la regulación de dicho proceso se ha investigado bastante, estableciendo a las auxinas y citocininas como las principales moléculas que participan. Sin embargo, se ha demostrado que otros reguladores del crecimiento como las giberelinas, el etileno, los brasinoesteroides, y el ácido abscísico también están involucrados (Jones y Ljung, 2012). En este trabajo sugerimos que el ON en respuesta al AJ a través del receptor COI1, está involucrado en esta compleja red de señales que da lugar a un balance entre división y diferenciación en el meristemo apical de la raíz y que a su vez modifica el patrón de divisiones en las células del periciclo para la iniciación de la formación de raíces laterales, probablemente mediante la participación de auxinas, ya que se sabe que en respuesta al MeJA se promueve la síntesis de auxinas dependiente del gen ANTHRANILATE SYNTHASE a1 (ASA1) y la atenuación en el transporte de auxinas al disminuir los niveles de expresión de los transportadores de flujo de auxinas PIN1 y PIN2 (Sun *et al.*, 2009).

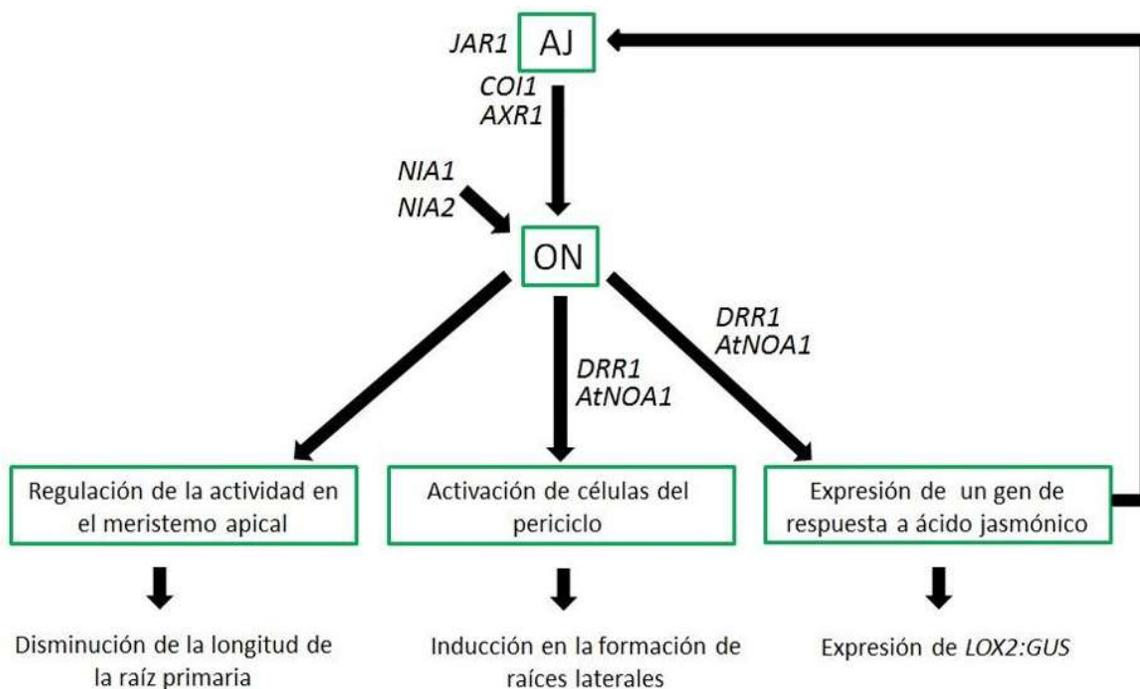


Figura 19. El óxido nítrico participa como molécula señalizadora en procesos fisiológicos mediados por el ácido jasmónico. Después de ser sintetizado el AJ es convertido a JA-Ile por la enzima JAR1, el JA-Ile es percibido por el receptor COI1, donde participa el elemento AXR1 en el complejo de ubiquitinación y degradación vía proteosoma. Una vez activada la ruta, el ON estaría participando como molécula de señalización para tres procesos fisiológicos: la regulación de la actividad en el meristemo apical, evidenciado por la disminución de la longitud de la raíz primaria; la activación de células del periciclo mostrado como la inducción en la formación de raíces laterales y la expresión del gen de respuesta a ácido jasmónico *LOX2*, señalado como un aumento en la expresión del marcador *LOX2:GUS*.

9. CONCLUSIÓN.

El óxido nítrico actúa cascada abajo en la señalización por AJ como un mediador celular para la regulación de la arquitectura radicular y la expresión del gen *LOX2* de respuesta temprana a AJ en *Arabidopsis thaliana*.

10. LITERATURA CITADA.

Acosta I.F. and Farmer E.E. (2010). Jasmonates. *The Arabidopsis Book*. 10.1199/tab. 0129.

Avanci N.C., Luche D.D., Goldaman G.H. and Goldman M.H.S. (2010). Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. *Genet. Mol. Res.* 9:484-505.

Beckers G.J. and Spoel S.H. (2006). Fine-tuning plant defense signaling: salicylate versus jasmonate. *Plant Biol.* 8: 1-10.

Beligni M.V. and Lamattina L. (2000). Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyls elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* 210:215-221.

Bell E. and Mullet J.E. (1993). Characterization of an Arabidopsis lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiol.* 103(4):1133-7.

Besson-Bard A., Pugin A. and Wendehenne D. (2008). New insights into nitric oxide signalling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:21–39.

Bethke P.C., Badger M.R. and Jones R.L. (2004). Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell* 16:332–41.

Bilgin DD, Zavala JA, Zhu J, Clough SJ, Ort DR, DeLucia EH. (2010). Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. *Plant Cell Environ.* 33(10):1597-613.

Bright J., Desikan R., Hancock J.T., Weir I.S. and Neill S.J. (2006). ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant J.* 45:113–22.

Browse J. (2009). Jasmonate passes muster: A receptor and targets for the defense hormone. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60:183-205.

Buchanan-Wollaston V., Page T., Harrison E., Breeze E. and Lim P.O. (2005). Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signaling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J.* 42:567–585.

Campos-Cuevas J.C., Ortiz-Castro R., Méndez-Bravo A., Raya-González J., Pelagio-Flores R. and López-Bucio J. (2008). Tissue culture of *Arabidopsis thaliana* explants reveals a stimulatory effect of alkamides on adventitious root formation and nitric oxide accumulation. *Plant Sci.* 174:165-173.

Chini A., Fonseca S., Fernandez G., Adie B., Chico J.M., Lorenzo O., Garcia-Casado G., Lopez-Vidriero I., Lozano F.M., Ponce M.R., Micol J.L. and Solano R. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signaling. *Nature* 448: 666-671.

Corpas F.J., Barroso J.B., Carreras A., Valderrama R., Palma J.M., León A.M., Sandalio L.M. and del Río L.A. (2006). Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta* 224:246–54.

Corpas,F.J., Palma J.M., del Río L.A. and Barroso J.B. (2009) Evidence supporting the existence of L-arginine- dependent nitric oxide synthase activity in plants. *New Phytol.* 184, 9–14.

Correa-Aragunde N., Graziano M., Chevalier C. and Lamattina L. (2006). Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. *J. Exp. Bot.* 57:581-588.

Crawford M.N.,Galli M.,Tischner R., Heimer Y.M., Okamoto M. and Mack A. (2006). Response to Zemojtel et al.: Plant nitric oxide synthase: back to square one. *Trends Plant Sci.* 11:526–27.

Dean J.V. and Harper J.E. (1986). Nitric oxide and nitrous oxide production by soybean and winged bean during the *in vivo* nitrate reductase assay. *Plant Physiol.* 82(3):718-23.

Delker C., Stenzel I., Hause B., Miersch O., Feussne I. and Wasterncack C. (2006). Jasmonate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*- enzymes, products, regulation. *Plant Biol.* 8:297-306.

Desikan R., Cheung M.K., Bright J., Henson D., Hancock J.T. and Neill S.J. (2004). ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signaling in stomatal guard cells. *J. Exp. Bot.* 55:205–12.

- Devoto A., Nieto-Rostro M., Xie D., Ellis C., Harmston R., Patrick E., Davis J., Sherratt L., Coleman M. and Turner J.G.** (2002). COI1 links jasmonate signaling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in *Arabidopsis*. *Plant J.* 32:457-466.
- Dolan L., Janmant K., Willemsen V., Linstead P., Poethig J., Roberts K. and Scheres B.** (1993). Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119:71-84.
- Durbak A., Yao H. and McSteen P.** (2012). Hormone signaling in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15:92-96.
- Farmer E.E., Ryan C.A.** (1990). Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:7713–7716
- Fernández-Marcos M., Sanz L. and Lorenzo O.** (2012). Nitric oxide: An emerging regulator of cell elongation during primary root growth. *Plant Signal Behav.* 7: 196–200.
- Fernández-Marcos M., Sanz L., Lewis D.R., Muday G. K., and Lorenzo O.** (2011). Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PIN-FORMED 1(PIN1)-dependent acropetal auxin transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108:18506-18511.
- Feys B., Benedetti C.E., Penfold C.N. and Turner J.C.** (1994). *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell* 6:751–759.
- Flores-Pérez U., Sauret-Güeto S., Gas E., Jarvis P. and Rodríguez-Concepción M.** (2008). A mutant impaired in the production of plastome-encoded proteins uncovers a mechanism for the homeostasis of isoprenoid biosynthetic enzymes in *Arabidopsis* plastids. *Plant Cell* 20:1303-1315.
- Fonseca S., Chini A., Hamberg M., Adie B., Porzel A., Kramell R., Miersch O., Wasternack C. and Solano R.** (2009). (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-iso-leucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat. Chem. Biol.* 5:344-350.

- Garces H., Durzan D. and Pedroso M.C.** (2001). Mechanical stress elicits nitric oxide formation and DNA fragmentation in *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Bot.* 87:553–707.
- Glazebrook J.** (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:205–227.
- Gray W. M.** (2004). Hormonal regulation of plant growth and development. *Plos Biol.* 2: 1270-1273.
- Grün S., Lindermayr C., Sell S. and Durner J.** (2006). Nitric oxide and gene regulation in plants. *J. Exp. Bot.* 57:507-516.
- Guo F.Q. and Crawford N.M.** (2005). *Arabidopsis nitric oxide synthase1* is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant Cell* 17:3436–3450.
- Guo F.Q., Okamoto M. and Crawford N.M.** (2003). Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* 302:100–3.
- Gupta K.J., Bauwe H. and Mur L.A.** (2011). Nitric oxide, nitrate reductase and UV-B tolerance. *Tree Physiol.* 31:795-797.
- He Y., Tang R.H., Hao Y., Stevens R.D., Cook C.W., Ahn S.M., Jing L., Yang Z., Chen L., Guo F., Fiorani F., Jackson R.B., Crawford N.M. and Pei Z.M.** (2004). Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science* 305:1968–1971.
- Herms D.A. and Mattson W.J.** (1992). The dilemma of plants: to grow or defend. *Q. Rev. Biol.* 67:283–335.
- Howe G.A. and Jander G.** (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:41–66.
- Huang X., Stettmaier K., Michel C., Hutzler P., Mueller M.J. and Durner J.** (2004). Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 218: 938–946.
- Ishiguro S., Kawai-Oda A., Ueda J., Nishida I., and Okada K.** (2001). The DEFECTIVE IN ANTHOR DEHISCENCE1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 2191-2209.

- Jones B. and Jung K.** (2012). Subterranean space exploration: the development of root system architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15:97-102.
- Kazan K. and Manners J.M.** (2008). Jasmonate signaling: toward an integrated view. *Plant Physiol.* 146: 1459-1468.
- Kepinski S.** (2006). Integrating hormone signaling and patterning mechanisms in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 28-34.
- Kojima H., Nakatsubo N., Kikuchi K., Kirino Y., Nahoshi H. and Hirata Y.** (1998). Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diamino fluoresceins. *Anal. Chem.* 70:2446–2453.
- Kunkel B.N. and Brooks D.M.** (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 325-331.
- Li L., Zhao Y., McCaig B.C., Wingerd B.A., Wang J., Whalon M.E., Pichersky E. and Howe G.A.** (2004). The tomato homolog of *coronatine-insensitive 1* is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *Plant Cell.* 16:126–143.
- Lillo C., Meyer C., Lea U.S., Provan F. and Oltedal S.** (2004). Mechanism and importance of post-translational regulation of nitrate reductase. *J. Exp. Bot.* 55:1275-1282.
- Lindermayr C., Saalbach G. and Durner J.** (2005). Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 137:921–930.
- López-Bucio J., Acevedo-Hernández G., Ramírez Chávez E., Molina-Torres J. and Herrera-Estrella L.** (2006). Novel signals for plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 523-529.
- López-Bucio J., Cruz-Ramírez A. and Herrera-Estrella L.** (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:280–287.
- Lorenzo O., Piqueras R., Sánchez-Serrano J.J. and Solano R.** (2003). ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* 15:165–78
- Malamy J.E. and Benfey P.N.** (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124:33–44.

Mandaokar A., Thines B., Shin B., Lange B.M., Choi G., Koo Y.J., Yoo Y.J., Choi Y.D., Choi G. and Browse J. (2006). Transcriptional regulators of stamen development in *Arabidopsis* identified by transcriptional profiling. *Plant J.* 46:984–1008.

Mauch-Mani B. and Slusarenko A.J. (1993). *Arabidopsis* as a model host for studying plant-pathogen interactions. *Trends Microbiol.* 1:265-270.

Méndez-Bravo A., Raya-González J., Herrera-Estrella L. and López-Bucio J. (2010). Nitric oxide is involved in alkamide-induced lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 51:1612-1626.

Moche M., Stremlau S., Hecht L., Göbel C., Feussner I. and Stöhr C. (2010). Effect of nitrate supply and mycorrhizal inoculation on characteristics of tobacco root plasma membrane vesicles. *Planta* 231: 425–436.

Moreau M., Lee G.I., Wang Y., Crane B.R. and Klessig D.F. (2008). AtNOS1/AtNOA1 is a functional *Arabidopsis thaliana* cGTPase and not a nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 283:32957-32967.

Morot-Gaudry-Talarmain Y., Rockel P., Moureaux T., Quilleré I., Leydecker M., Kaiser W. and Morot-Gaudry J. (2002). Nitrite accumulation and nitric oxide emission in relation to cellular signaling in nitrite reductase antisense tobacco. *Planta* 21:708-715.

Morquecho-Contreras A., Méndez-Bravo A., Pelagio-Flores R., Raya-González J., Ortíz-Castro R. and López-Bucio J. (2010). Characterization of *drr1*, an alkamide-resistant mutant of *Arabidopsis*, reveals an important role for small lipid amides in lateral root development and plant senescence. *Plant Physiol.* 152:1659-73.

Narvaez-Vasquez J., Florin-Christensen J. and Ryan C.A. (1999). Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, systemin, and oligosaccharide elicitors in tomato leaves. *Plant Cell.* 11:2249-60.

Neill S., Bright J., Desikan R., Hancock J., Harrison J. and Wilson I. (2008). Nitric oxide evolution and perception. *J. Exp. Bot.* 59:25-35.

Neill S.J., Desikan R. and Hancock T.T. (2003). Nitric oxide signalling in plants. *New Phytol.* 159:11–35.

- Neill S.J., Desikan R., Clarke A. and Hancock J.T.** (2002). Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol.* 128:13-16.
- Orozco-Cardenas M.L. and Ryan C.A.** (2002). Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants. *Plant Physiol.* 130:487-493.
- Ortiz-Castro R. y López-Bucio J.** (2010). La arquitectura de las plantas. *FRONTERAS EN LA BIOLOGÍA DEL DESARROLLO DE LAS PLANTAS.* Eds. Beltrán-Peña E. y López-Bucio J. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. pp. 3-14.
- Pauwels L., Morreel K., De Witte E., Lammertyn F., Van Montagu M., Boerjan W., Inze D., and Goossens A.** (2008). Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured *Arabidopsis* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 1380-1385.
- Planchet E., Jagadis Gupta K., Sonoda M. and Kaiser W.M.** (2005). Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *Plant J.* 41:732–743.
- Polverari A., Molesini B., Pezzotti M., Buonauro R., Marte M. and Delledonne M.** (2003). Nitric oxide-mediated transcriptional changes in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16:1094-1105.
- Reymond P., Bodenhausen N., Van Poecke R.M., Krishnamurthy V., Dicke M. and Farmer E.E.** (2004). A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. *Plant Cell* 16: 3132-3147.
- Rockel P., Strube F., Rockel A., Wildt J. and Kaiser W.M.** (2002). Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *J. Exp. Bot.* 53:103–10.
- Santner A. and M. Estelle.** (2009). Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. *Nature.* 459:1071-1078.
- Scheres B., Benfey P. and Dolan L.** (2002). Root Development. *The Arabidopsis Book.* American Society of Plant Biologist.

Schommer C., Palatnik J. F., Aggarwal P., Chételat A., Cubas P. and Farmer E.E. (2008). Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. *Plos Biol.* 6:1991-2001.

Staswick P.E. (2009). The tryptophan conjugates of jasmonic and indole-3-acetic acids are endogenous auxin inhibitors. *Plant Physiol.* 150:1310-1321.

Staswick P.E. and Tiryaki I. (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 2117-2127.

Staswick P.E., Su W., and Howell S.H. (1992). Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6837-6840.

Stohr C., Strube F., Marx G., Ullrich W.R. and Rockel P. (2001). A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* 212:835- 841.

Stuehr D. J, Santolini J., Wang Z. Q., Wei C. C. and Adak S. (2004). Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. *J. Biol. Chem.* 279: 36167–36170.

Sun J., Xu Y., Ye S., Jiang H., Chen Q., Liu F., Zhou W., Chen R., Li X., Tietz O., Wu X., Chen J.D., Palme K. and Lia C. (2009). *Arabidopsis* ASA1 is important for jasmonate- mediated regulation of auxins biosynthesis and transport during lateral root formation. *Plant Cell* 21:1495–1511.

Thines, B., Katsir L., Melotto M., Niu Y., Mandaokar A., Liu G., Nomura K., He S.Y., Howe G.A., and Browse J. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{COI1} complex during jasmonate signalling. *Nature* 448: 661-665.

Tiryaki I. and Staswick P.E. (2002) An *Arabidopsis* mutant defective in jasmonate response is allelic to the auxin-signaling mutant *axr1*. *Plant Physiol.* 130: 887–894.

Tun N.N., Santa-Catarina C., Begum T., Silveira V., Handro W., Floh E. and Scherer G.F. (2006). Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *A. thaliana* seedlings. *Plant Cell Physiol.* 47:346–54.

von Malek B., van der Graaff E., Schneitz K. and Keller B.. (2002). The *Arabidopsis* male-sterile mutant *dde2-2* is defective in the ALLENE OXIDE

SYNTHASE gene encoding one of the key enzymes of the jasmonic acid biosynthesis pathway. *Planta* 216:187-192.

Wang P., Du Y., Li Y., Ren D. and Song C. (2010). Hydrogen peroxide-mediated activation of MAP kinase 6 modulates nitric oxide biosynthesis and signal transduction in Arabidopsis. *Plant Cell* 22:2981-2998.

Wasternack C. (2007). Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann. Bot.*100:681-697.

Wendehenne D., Pugin A., Klessig D.F. and Durner J. (2001). Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci.* 6: 177-183.

Wilkinson J.Q. and Crawford N.M. (1993). Identification and characterization of chlorate-resistant mutant of Arabidopsis thaliana with mutations in both nitrate reductase structural genes NIA1 and NIA2. *Mol. Gen. Genet.* 239: 289–297

Wünsche H., Baldwin I.T. and Wu J. (2011). Silencing NOA1 elevates herbivory-induced jasmonic acid accumulation and compromises most of the carbon-based defense metabolites in *Nicotiana attenuata*. *J. Integr. Plant Biol.* 53:619-631.

Xie D.X., Feys B.F., James S., Nieto-Rostro M., and Turner J.G. (1998). COI1: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* 280: 1091-1094.

Yamasaki H. and Cohen M. F. (2006). NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? *Trends Plant Sci.* 11: 522–24.

Yamasaki H. and Sakihama Y. (2000). Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: *in vitro* evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett.* 468, 89–92.

Yan J., Zhang C., Gu M., Bai Z., Zhang W., Qi T., Cheng Z., Peng W., Luo H., Nan F., Wang Z., and Xie D. (2009). The Arabidopsis CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. *Plant Cell* 21: 2220-2236.

Yan Y., Stolz S., Chetelat A., Reymond P., Pagni M., Dubugnon L., and Farmer E.E. (2007). A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *Plant Cell* 19: 2470-2483.

Yoshida Y., Sano R., Wada T., Takabayashi J. and Okada K. (2009). Jasmonic acid control of GLABRA3 links inducible defense and trichome patterning in *Arabidopsis*. *Development* 136: 1039-1048.

Zeidler D., Zahringer U., Gerber I., Dubery I., Hartung T., Bors W., Hutzler P. and Durner J. (2004). Innate immunity in *A. thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:15811–15816.

Zemojtel T., Fröhlich A., Palmieri M.C., Kolanczyk M., Mikula I., Wyrwicz L.S., Wanker E.E., Mundlos S., Vingron M., Martasek P. and Durner J. (2006). Plant nitric oxide synthase: a never-ending story? *Trends Plant Sci.* 11:524–525.

Ziegler J., Stenzel I., Hause B., Maucher H., Hamberg M., Grimm R., Ganai M. and Wasternack C. (2000). Molecular cloning of allene oxide cyclase. The enzyme establishing the stereochemistry of octadecanoids and jasmonates. *J. Biol. Chem.* 275:19132–19138.

11. APÉNDICE

Publicaciones relacionadas con este trabajo:

- Garnica Vergara A., Raya González J., López Bucio J. y Beltrán Peña E. (2012). Señalización del ácido jasmónico y el óxido nítrico durante el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. *Ciencia Nicolaita*.55: 28-41.