



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas

**Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas
Opción en Biología Experimental**

“Estudio de la interacción del ácido jasmónico y las citocininas en la respuesta de la raíz de *Arabidopsis thaliana* al aminolípido bacteriano *N,N*-dimetil hexadecilamina”.

Tesis que presenta:

Ernesto Vázquez Chimalhua

Para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biológicas

Directores de tesis:

Dr. Eduardo Valencia Cantero

Dr. José López Bucio



Morelia, Michoacán, Noviembre del 2019

La mente es inquieta, turbulenta, obstinada y muy fuerte, ¡oh, Kṛṣṇa!, y someterla, creo yo, es más difícil que controlar el viento.

Bhagavad-gita

Dedicatoria

A

KARLA TZHITZHIKI Y NABANI

Con Quienes daré infinidad de pasos
y a mis padres y hermanos
quienes me enseñaron a caminar.

Agradecimientos

El presente trabajo de tesis realizado en la heroica Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, es el resultado del esfuerzo de varias personas del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, de las cuales he tomado como enseñanzas sus virtudes.

Inicialmente agradezco a mi asesor, el Doctor Eduardo Valencia Cantero, por haberme recibido en su laboratorio y dado la oportunidad de estudiar y hacer ciencia. Además, por su calidad humana, paciencia y los ánimos que me impulsaron a pesar de mis errores y caídas.

Al Doctor José López Bucio, por su confianza, disposición y consejos sobre el desarrollo del proyecto y el de mi persona. Particularmente por haberme prestado las llaves su laboratorio para realizar buena parte del trabajo de investigación. Con el apoyo de estas dos grandes personas, pude realizar el trabajo.

A mi tutora, la Doctora Elda Beltrán Peña por su atención e interés que me motiva cada que la veo. También al Doctor Homero Reyes de la Cruz que en otrora puesto de director me apoyó para conseguir la beca de Universidad.

Estuve en dos laboratorios simultáneamente y los estudiantes en ambos me trataron de lo mejor, convivimos en las situaciones difíciles y felices y siempre fueron estoicos, a todos ellos (no los menciono individualmente porque son muchos) les agradezco por su amistad y participación en este trabajo.

Durante este tiempo tuve el apoyo y compañía de mucha gente no cerniente al IIQB pero si a la Universidad que me ayudaron mucho, desde cosas relacionadas al uso de computadora hasta alimentación y hospedaje, a todas estas personas que están en mi mente, gracias.

Hubo personas fuera de la universidad que me ayudaron en muchas cosas y aspectos, a todas estas mis sinceros agradecimientos. Por cierto, enorme agradecimiento a Alexandra Elbayan por la creación de la página subversiva sci-hub que facilitó la adquisición de casi todos los artículos utilizados para la realización de este trabajo.

En general a todos gracias.

Índice de contenido

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1. Crecimiento y desarrollo vegetal.....	3
2.1.1. Meristemos.....	3
2.1.2. Características de los meristemos.....	4
2.1.3. Actividad y composición del meristemo apical de la raíz.....	6
2.1.4. Estructura y función del meristemo del brote apical.....	7
2.1.5. Identidad y mantenimiento del centro quiescente del meristemo apical de la raíz.....	8
2.1.6. Programas de crecimiento determinado e indeterminado.....	8
2.2. Generalidades del sistema inmunológico de las plantas.....	10
2.2.1. Características de la inmunidad activada por patrones moleculares asociados a microbios y daño.....	12
2.2.2. Inmunidad activada por efectores.....	15
2.3. Biosíntesis, señalización y respuesta del ácido jasmónico.....	18
2.4. Biosíntesis, señalización y respuesta de las citocininas.....	23
2.5. Descripción de <i>Arthrobacter agilis</i>	27
2.5.1. Compuestos volátiles orgánicos producidos por <i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2 y efecto de la <i>N,N</i> -dimetil hexadecilamina (DMHDA) en plantas.....	29
3. Justificación.....	30
4. Hipótesis.....	31
5. Objetivo general.....	31
5.1. Objetivos particulares.....	31
6. Resultados.....	32
6.1. Capítulo 1.....	33
7. Discusión.....	48
8. Conclusión.....	51
9. Bibliografía.....	52

10. Addenda.....	67
10.1. Addendum I.....	68
10.2. Addendum II.....	81
10.3. Addendum III.....	85
10.4. Addendum IV.....	86
10.5. Addendum V.....	87
10.6. Addendum VI.....	88

Resumen

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) son vitales para el crecimiento, desarrollo, adaptación y colonización de ambientes nuevos o a condiciones de escasos nutrientes y agua mediante diferentes mecanismos. Los compuestos volátiles orgánicos (VOC) intervienen en la homeostasis hormonal de las plantas, entre los cuales destaca la dimetil hexadecilamina (DMHDA), un aminolípido producido por bacterias con capacidad de modificar el crecimiento de la raíz y el desarrollo de diferentes especies vegetales.

En el presente trabajo se investigaron las interacciones hormonales que participan en la modulación de la respuesta a la DMHDA en *Arabidopsis thaliana*, encontrando que la respuesta de *A. thaliana* a la DMHDA es dependiente de la vía de señalización del ácido jasmónico, y que tanto la DMHDA como el AJ interfieren con la modulación en la respuesta a citocininas (CK). Lo anterior correlaciona con una disminución en el crecimiento de la raíz primaria, que ocurre como una respuesta sistémica que inicia desde el follaje y se extiende hasta las zonas de crecimiento radical. Entonces la DMHDA tiene su efecto sobre las plantas mediante la estimulación de la vía de señalización del AJ, una hormona de defensa que antagoniza el crecimiento a través de la represión de la vía de señalización de las CK.

Los resultados mencionados abren un nuevo panorama sobre las interacciones planta-bacteria mediados por volátiles y permitieron evidenciar que distintas respuestas hormonales pueden orquestar el desarrollo y la defensa de manera simultánea.

Palabras clave: Hormonas, antagonismo, crecimiento, defensa, rizobacterias.

Abstract

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are vital for growth, development, adaptation and colonization to new environments or scarce nutrients and water conditions by means of different mechanism. Volatile organic compounds (VOC) intervene in plant hormonal homeostasis, among them dimethyl hexadecylamine (DMHDA) stand out, it is a bacterial-produced aminolipid capable to modify root growth and development of different species vegetables.

In this thesis work, hormonal interactions modified by DMHDA were investigated, we corroborated that JA signaling pathway is activated and both DMHDA and JA interfere with cytokinins (CK) response. This correlates with a primary root growth decrease, that occurs as a systemic response starting from foliage and extending to root growth zones. So DMHDA has its effect on plants by means of JA signaling pathway stimulation. A defense hormone antagonizing growth through CK signaling pathway repression.

Results afore mentioned open a new landscape about plant-bacteria interactions mediated by VOC and allow us evidence that different hormonal response may orchestrate development and defence simultaneously.

Keywords: Hormones, antagonism, growth, defense, rhizobacteria.

1. Introducción

Desde que colonizaron el suelo, las plantas han coexistido con microorganismos con los cuales formaron interacciones simbióticas, dando paso a la evolución de adaptaciones que mejoran las adecuaciones de ambos simbioses interactuantes (Revillini *et al.*, 2016). Dentro de un proceso de interacción ecológica estrecha entre dos o más especies, se pueden mejorar las adaptaciones de una especie en respuesta a la presión selectiva positiva impuesta por la otra especie interactuante y el efecto puede ser recíproco. La presión selectiva entre las especies interactuantes depende de su naturaleza y la fuerza de sus asociaciones (Occhipinti, 2013). La co-evolución es capaz de originar y dirigir una especiación ecológica, manteniendo y promoviendo la diversidad biológica (Biere y Tack, 2013).

La raíz es la encargada del anclaje de la planta, la absorción del agua, sales minerales, nutrientes, producción de hormonas e incluso provee un complejo microambiente susceptible a la colonización de hongos y rizobacterias formando comunidades que tienen potencial tanto de biocontrol de plagas, como biorremediación detoxificando suelos de metales pesados (Gouda *et al.*, 2018). Las PGPR (bacterias rizosféricas promotoras del crecimiento de las plantas) habitan la rizósfera (volumen de suelo influenciado por la raíz) y pueden proteger a la planta hospedera del estrés ambiental y del ataque de microorganismos patógenos (Timmusk *et al.*, 2005; Gouda *et al.*, 2018). Un ejemplo de lo anterior es lo que ocurre con *Paenibacillus polymyxa*, el cual, además de conferir resistencia contra los patógenos *Pythium aphanidermatum* y *Phytophthora palmivora*, es capaz de mejorar la tolerancia a sequía mediante la creación de una matriz rica en polisacáridos extracelulares (EPS) sobre la raíz (Timmusk y Nevo, 2011). Se ha demostrado que la aplicación de las PGPR tiene un efecto fitoestimulante, al mejorar la salud y productividad de los cultivos bajo condiciones normales o de estrés (Ahemad and Kibret, 2014).

Las PGPR también son capaces de sintetizar biomoléculas que modulan la arquitectura de la raíz a través de la interferencia de los balances hormonales. Por ejemplo, *Pseudomonas fluorescens* produce el compuesto antimicrobiano DAPG (2,4-diacetylphloroglucinol) que interfiere en la vía de señalización de auxinas y modifica la morfología de la raíz, estimulando la formación de raíces laterales en plántulas de

tomate (Vacheron *et al.*, 2013). De manera similar, la mezcla de compuestos orgánicos volátiles (COVs) emitidos por *P. fluorescens* WCS417 estimula el crecimiento de la raíz primaria, la formación de raíces laterales y aumenta la biosíntesis de auxinas (Zamioudis *et al.*, 2013). Dentro de la mezcla de COV de *B. subtilis* GB03, la acetoina (3-hidroxi-2-butanona) y 2,3-butanediol incrementan el área foliar de *A. thaliana*, siendo la vía de señalización de citocininas la responsable en la promoción del crecimiento en este caso (Ryu *et al.*, 2003).

La *N,N*-dimetil-hexadecilamina (DMHDA), es un COV emitido por algunas PGPRs como *Bacillus subtilis* G8, *Arthrobacter agilis* UMCV2, *Sinorhizobium meliloti* 1021 y *Pseudomonas fluorescens* UM270 (Liu *et al.*, 2008; Velázquez-Becerra *et al.*, 2011; Orozco-Mozqueda *et al.*, 2013; Hernández-León *et al.*, 2015). La DMHDA modifica el desarrollo de la raíz en especies filogenéticamente distantes a través de la activación de la vía de señalización del ácido jasmónico (Velázquez-Becerra *et al.*, 2011; Castulo-Rubio *et al.*, 2015; Valencia-Cantero *et al.*, 2015; Raya-González *et al.*, 2017).

En los últimos 20 años se ha incrementado la variabilidad climática extrema, aumentando casi un 50% los daños o pérdidas en los cultivos agrícolas a nivel mundial (FAO, 2018). En México, cerca del 37% del territorio nacional son tierras de cultivo agrícola, bosques y selvas, siendo medios rurales que originan la mayoría de los productos alimenticios que se consumen. En las poblaciones rurales se contiene poco menos del 40% de la población de nuestro país, contradictoriamente, la mayoría vive en pobreza alimentaria (FAO, 2009). Ante estos retos ambientales y sociales, el entendimiento de las funciones del sistema radicular generado por las investigaciones en ciencia básica puede aplicarse para diseñar estrategias de manejo y así incrementar la producción de una forma más amigable con el ambiente. De tal manera que, se podrían mitigar las consecuencias de los cambios climáticos extremos como sequías o inundaciones que, en parte, son causa de la inseguridad alimentaria en las poblaciones rurales y urbanas al afectar las cosechas.

2. Antecedentes

2.1. Crecimiento y desarrollo vegetal.

Después de que una planta germina a partir de una semilla, se desarrollan los tejidos dérmicos, vasculares y todos los órganos estructurales, a partir de linajes celulares específicos en el nicho de células iniciales ubicado en los meristemos apicales del follaje y raíz (Burian *et al.*, 2016). A diferencia de los animales, las plantas pueden remodelar su arquitectura radicular y foliar y crear nuevos órganos a partir de los meristemos apicales y laterales (Heidstra y Sabatini, 2014).

2.1.1. Meristemos.

Durante la evolución de las plantas terrestres, los meristemos fueron innovaciones morfológicas tan eficientes para su desarrollo que les permitieron la formación de estructuras complejas como la vasculatura, los tallos, las hojas y las raíces (Bennett, 2015). Tanto el meristemo apical de la raíz (MAR) como del brote apical (MBA) presentan una población pequeña de células iniciales indiferenciadas cuya función consiste en generar células diferenciadas destinadas a la formación de tejidos u órganos. La compleja morfología de las plantas está coordinada por las actividades de los meristemos y la organogénesis (Leiboff *et al.*, 2015).

Las divisiones de las células iniciales en la zona central del MAR generan células de división rápida, que al ser desplazadas permiten el establecimiento de una zona de transición y posteriormente de una zona de elongación-diferenciación en la raíz (Bitonti y Chiappetta, 2011). En el MBA, la zona periférica al CO (que marca el límite entre la división y la diferenciación) presenta células que eventualmente se diferenciarán en los primordios de las hojas (Skylar y Wu, 2011). Las células meristemáticas son pequeñas y con citoplasmas densos, mientras que las de la zona de transición empiezan a alargarse e inician su diferenciación. Cuando las células transcurren a la zona de elongación, los núcleos son empujados por vacuolas grandes hacia la pared celular. Posteriormente, en la zona de diferenciación las células alcanzan su tamaño máximo aunado a una diferenciación específica que da origen a los primordios de órganos (Takatsuka y Umeda, 2013). En la organogénesis, la célula indiferenciada fundadora es la primera destinada a convertirse en algún tipo de tejido u órgano, para lo cual transita por una serie de divisiones hasta alcanzar su función

específica. En el estado diferenciado, las células pueden responder a señales de activación que dan como resultado un primordio, el cual posteriormente formará órganos y tejidos especializados. Es importante notar que las fases de proliferación y diferenciación están espacial y temporalmente separadas (Chandler, 2011).

Las células vegetales presentan una pared rígida que les impide moverse activamente, sin embargo, son desplazadas pasivamente por las divisiones que se llevan a cabo durante el desarrollo de un tejido (Gailloch et al., 2015). Así, el destino de las células hijas durante y después de la división está controlado por factores intrínsecos (ARNs y proteínas) y también por señales extrínsecas (luz y agua) (Hove y Heidstra, 2008). La combinación de las señales externas junto con la respuesta fisiológica, cambian el destino celular hasta que llegan a la etapa de diferenciación y la formación de un órgano. La capacidad de regular el cambio del destino celular requiere una comunicación continua entre los diferentes dominios funcionales de la planta. El acoplamiento entre la actividad y mantenimiento de los meristemos, junto con la división y diferenciación durante la organogénesis, requiere de una transmisión de señales intercelulares a través de los diferentes dominios. En dichas vías de señalización que regulan finamente el desarrollo de las plantas, participan las fitohormonas, péptidos y programas de transcripción genética. El centro quiescente pluripotente, localizado en medio del grupo de células iniciales tiene como función primordial proveer células nuevas al nicho de las iniciales y controlar el destino de las células hijas, las cuales progresivamente se convertirán en tejidos y órganos diferenciados.

2.1.2. Características de los meristemos.

Los meristemos del brote apical y de la raíz se forman durante la embriogénesis y se localizan en las puntas de sus respectivos ejes (**Fig. 1A**) (Doerner, 2003). Estas estructuras, controlan el número, el tiempo de aparición y la forma de los órganos, todos ellos eventos regulados por el ambiente y el estado genético de la planta (Bennett y Leyser, 2006).

Específicamente, en *Arabidopsis* el MBA cambia su identidad para producir meristemos axilares (MA), durante la transición de la fase vegetativa a la de floración. Los MA se forman entre el MBA y el primordio de la hoja (Doerner, 2003); dicha zona se caracteriza por presentar una concentración mínima de auxinas. Tal fenómeno

quedó de manifiesto en las mutantes *pin1* (uno de los acarreadores de flujo de auxinas) que presentaron una formación defectuosa de los MA (Hofmann, 2014).

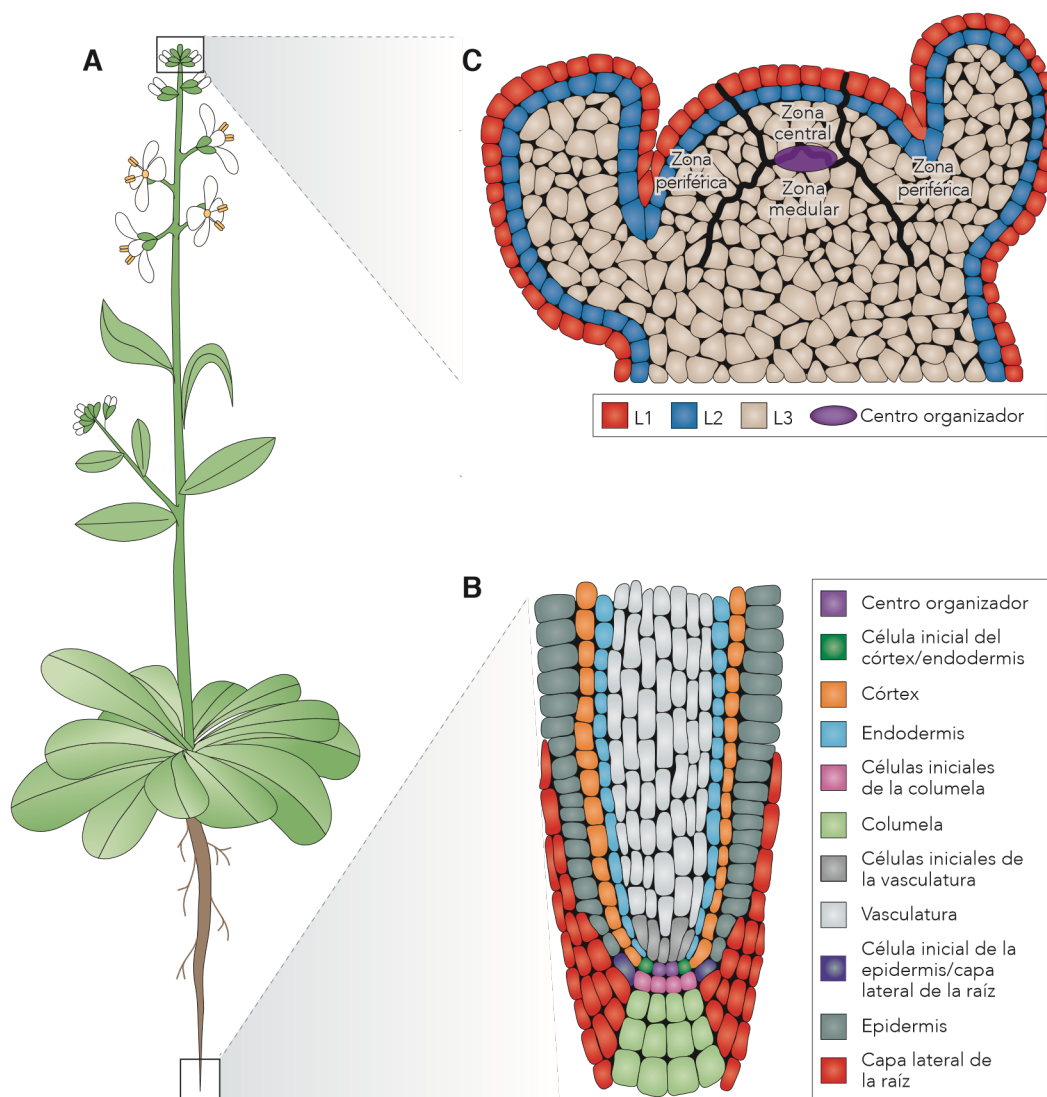


Figura 1. Arquitectura de los meristemos en *Arabidopsis*. (A) La organogénesis depende de los meristemos basal y radicular. (B) El MAR es radialmente simétrico y consiste de un centro de células quiescentes (CQ) rodeado por cuatro tipos de células iniciales (columela, epidermis/capa lateral de la raíz, corteza/endodermis y vasculatura/periciclo). La división de las células iniciales genera linajes que conforman el meristemo, el cual está delimitado hasta la zona transitoria a la elongación/diferenciación. (C) El MBA contiene tres capas (L1, L2 y L3) y tres zonas de desarrollo: periférica (ZP), central (ZC) y la zona medular (ZM). El centro organizador (CO) se localiza en la conjunción de las tres zonas y mantiene el nicho de células fuente. La división de las células iniciales de la ZC genera células amplificadoras transitorias que forman la ZP y posteriormente se diferencian a un primordio de órgano (PO). Adaptado de Sparks *et al.*, 2013.

Posteriormente, durante la fase reproductiva (después de la transición floral), la naturaleza y propiedades de los meristemas axilares nuevamente cambia al crearse los meristemas de las inflorescencias que darán origen a las flores (Benlloch *et al.*, 2007). De hecho, los meristemas laterales axilares y de las inflorescencias son estructuras homólogas, cuyos patrones de expresión genéticos son similares (Bennett y Leyser, 2006). Al contrario del MAB, en el MAR no se observan cambios de identidad durante el desarrollo (Doerner, 2003), no obstante, ambas estructuras presentan un nicho de células iniciales que al dividirse generan células nuevas que se diferenciarán en diferentes tipos celulares (Stahl y Simon, 2010). El microambiente del nicho de células fuente, es el responsable del desarrollo pos-embriionario de los órganos completos (Tucker y Laux, 2007). Interesantemente, a pesar de la distancia evolutiva tan grande con las plantas, en el nicho de células madre de animales que sustenta al tejido específico adulto se conservan factores similares a los que mantienen reprimida la diferenciación del nicho de las células fuente vegetales (Scheres, 2007).

2.1.3. Actividad y composición del meristemo apical de la raíz.

En la base de la raíz se encuentra el MAR, embebido en el interior del meristemo proximal donde se localiza el nicho de células fuente. Las células iniciales producen todos los tejidos de la raíz a partir de cuatro tipos celulares: columela, epidermis/capa lateral de la raíz, corteza/endodermis y vasculatura/periciclo. En el nicho de células fuente se presenta un centro de células quiescentes (CQ) (**Fig. 1B**) que controla el destino de las células iniciales (Ni *et al.*, 2014). En *A. thaliana*, el CQ se compone de cuatro células que raramente se dividen y que funciona tanto para producir células iniciales como para mantener mitóticamente activas y en estado indiferenciado a las células que lo rodean (Dinneny y Benfey, 2008).

La división de las células iniciales genera una célula de auto-renovación que mantiene a la inicial y forma a una célula hija; de esta última, se generan células conocidas como amplificadoras transitorias que progresivamente se desplazan hasta alcanzar la zona de transición en la raíz primaria. Cuando estas células amplificadoras llegan a la zona de elongación y diferenciación adquieren las propiedades específicas del tejido, de tal manera que el crecimiento y desarrollo de la arquitectura de la raíz es sostenido por el MAR (Perilli *et al.*, 2012), donde el mantenimiento y funcionamiento del CQ es vital en la integridad de la raíz. En *A. thaliana*, la relación entre el tamaño de la raíz,

el meristemo y el CQ es muy clara. El CQ de otros tipos de raíces presenta diferentes formas que les permite amoldarse al patrón de las células en división (Dubrovsky y Barlow, 2015). Además, en las raíces finas de árboles y plantas herbáceas la existencia del CQ no ha sido confirmada e incluso en determinados cactus no se ha localizado el CQ en la raíz (Barlow, 2015).

2.1.4. Estructura y función del meristemo del brote apical.

El MBA se localiza en la punta del brote apical y comprende tres capas sobrepuestas de células distintas (L1-L3). La L1, al ser la más externa, contacta con el medio ambiente y mediante divisiones anticlinales forma la epidermis. La capa inferior L2 se divide anticlinalmente y genera el tejido fundamental, mientras que la más interna (L3) se divide de forma anticlinal y periclinal produciendo la vasculatura (Gaillochet *et al.*, 2015). En el MAB se observan tres regiones: la zona central (ZC) de baja división celular, la periférica (ZP) con divisiones celulares más rápidas y la zona medular (ZM) (Skylar y Wu, 2011). La ZC se sitúa dentro de las capas celulares L1-L3 del meristemo donde también se ubican las células iniciales. En la capa L3 localizada en la base del meristemo, yace el centro organizador (CO) (**Fig. 1C**), el cual, al igual que el CQ del MAR rara vez se divide (Gaillochet y Lohmann, 2015). Para ser incorporados a los primordios de hojas o tallo, los linajes de células derivadas de las divisiones de las células iniciales en la ZC requieren ser impulsados lateralmente hacia la ZP o en forma basal hacia la ZM (Wyrzykowska *et al.*, 2006). El CO a pesar de contar con escasas células quiescentes, tiene un efecto directo sobre las células vecinas iniciales de la ZC, las cuales son las células fundadoras de los dominios diferenciados de las plantas. El CO está implicado en varias funciones: sustentar a las células iniciales, aumentar el proceso mitótico y controlar la pluripotencia de la zona, por tal motivo la actividad y mantenimiento del CO regula el tamaño del meristemo y por consecuencia el funcionamiento correcto del MBA (Ueda *et al.*, 2004; Daum *et al.*, 2014).

2.1.5. Identidad y mantenimiento del centro quiescente del meristemo apical de la raíz.

El número de células en el CQ varía entre las especies de plantas, en maíz *Zea mays* es de 500 hasta 1200 células y en *Arabidopsis* como se mencionó antes está formado solo por cuatro células (Heyman *et al.*, 2014). En maíz, las células del CQ se encuentran detenidas en la fase G1 del ciclo celular hasta por 150 h, a diferencia de las células iniciales que lo rodean, donde la misma fase dura alrededor de 2 h o menos (Clowes, 1965). Se ha observado que la eliminación de células de la raíz al tratarlas con rayos X provoca el acortamiento de la raíz, además de activar la división celular del CQ y detenerla en las células iniciales circundantes (Barlow, 2015). En *A. thaliana*, la eliminación del CQ con un rayo láser indujo la diferenciación de las células iniciales (van den Berg *et al.*, 1997). Así que, mientras las células del CQ permanezcan latentes e indiferenciadas, las iniciales circundantes serán mitóticamente activas con un grado de diferenciación incipiente. Lo antes mencionado, comprueba que para mantener el nicho de células fuente, se requiere de una conexión de señales de corta distancia entre las células que lo forman.

2.1.6. Programas de crecimiento determinado e indeterminado.

El tiempo de vida de las plantas varía desde unas semanas hasta miles de años, como es el caso de los baobabs africanos (*Adansonia digitata*) o del *Pinus longevae* ubicado en California, EUA. La longevidad de estos árboles milenarios depende de la actividad indeterminada de los meristemos vegetativos ubicados en los ápices de los brotes axiales (raíz y tallo), axilares y el cámbium vascular (meristemo secundario), los cuales están genéticamente programados para que crezcan indefinidamente. El envejecimiento de los meristemos vegetativos no afecta su funcionamiento debido a la baja tasa de división celular y de mutación del nicho celular contenido, además de su tipo de disposición (Munné-Bosch, 2018). Cuando se pierde la dominancia apical, la reiteración (desarrollo ramificado lateral producido por la diferenciación de un meristemo axilar) y el crecimiento radial o secundario (por el cámbium vascular) permiten el aumento circunferencial, prolongando el crecimiento indeterminado y previniendo la senescencia, como es el caso del árbol del Tule en Oaxaca que mide 11 metros de circunferencia (Munné-Bosch, 2018; Tonn y Greb, 2017).

Se asume que el nicho de células iniciales del MAR puede mantener un crecimiento indeterminado al producir continuamente nuevas células. Pero cuando las condiciones ambientales no son adecuadas o la raíz alcanza una edad, tamaño y estado determinado, cesa de crecer, algunas veces de forma latente y otras definitiva (Shishkova *et al.*, 2008).

Otro clase de plantas con vidas tan longevas con más de cien años, son las pertenecientes a la familia de las Cactaceae como el saguaro, *Carnegiea gigantea* (Orum *et al.*, 2016). Además, los cactus han desarrollado estrategias alternas para adaptarse a condiciones desérticas con escasas de agua. Tienen un crecimiento radial anómalo debido a la existencia de múltiples y sucesivos cambiums, formando grandes cantidades de tejido parenquimatoso que guardan carbohidratos o agua (Tonn y Greb, 2017). Menos común es el crecimiento determinado constitutivo (ocurre incluso en suficiencia de nutrientes) que presenta la raíz primaria de los cactus, este no se ha visto en ninguna otra clase de planta (Shishkova *et al.*, 2008; Rodríguez-Alonso *et al.*, 2018). El crecimiento determinado programado se ha observado en las raíces laterales de plantas filogenéticamente muy distintas incluyendo las de *Opuntia arenaria*, *O. tunicata*, *Zea mays*, también raíces laterales proteoides de plantas de la familia Proteaceae, Fabaceae, entre otras; y en las raíces adventicias de *Ficus pumila* (Rodríguez-Alonso *et al.*, 2018).

En todos los casos de crecimiento determinado el MAR se agota, es decir, se reduce y luego se pierde porque se extingue el centro quiescente y el nicho de células iniciales deja de dividirse, por lo tanto no se producen nuevas células. Las células meristemáticas crecen periclinal y anticlinalmente, se induce la diferenciación celular formandose la vasculatura (xilema y floema), pelos radicales y raíces laterales cerca de la punta de la raíz, mientras que, la capa (lateral) en el ápice de la raíz deja de formarse (Shishkova *et al.*, 2008). En un meristemo exhausto o agotado, las células diferenciadas pueden realizar funciones correspondientes a las células de la zona de diferenciación (Rodríguez-Alonso *et al.*, 2018).

El crecimiento, desarrollo y duración de vida de las plantas están interconectados. Los meristemas, por una parte, sostienen el crecimiento y desarrollo, mientras que la longevidad está asociada a un crecimiento lento pero constante en respuesta a las condiciones o presión impuesta por el estrés biótico o abiótico, seleccionándose a las plantas mejor adaptadas y con mayor resistencia o resiliencia.

2.2. Generalidades del sistema inmunológico de las plantas.

Durante el ciclo de vida de una planta, las fitohormonas llevan a cabo diversas funciones esenciales concernientes al desarrollo, crecimiento y reproducción. Predominantemente, a través del ácido salicílico (AS), etileno (Et) y ácido jasmónico (AJ), se hace frente a diversos organismos patógenos y a una plétora de condiciones climáticas adversas que amenazan su subsistencia y reproducción, es decir, al estrés biótico y abiótico (Shamrai, 2014). De acuerdo a su estilo de vida, en general los fitopatógenos se dividen en biótrosos (se alimentan de tejido vivo del hospedero), necrótrofos (matan las células del tejido y se alimentan de los restos) y hemibiótrosos (tiene un fase inicial asintomática biótropa y ulteriormente cambian a una fase necrótrófica destructiva). La vía de señalización y respuesta al AS confiere resistencia a patógenos (hemi)biótrosos y virus. Mientras que la proliferación de necrótrofos, herbívoros masticadores o succionadores (e.g. afidos) es restringida por la vía de señalización y respuesta al AJ y Et (Thaler et al., 2004).

Desde su origen, las plantas han co-evolucionado con organismos tanto benéficos como patógenos, como son los hongos, bacterias, insectos, virus, nematodos, etc. De tal suerte que se han ido conformando programas genéticos para el soporte inmunológico durante la interacción planta-patógeno, que son altamente especializados (Mengiste, 2012; de Vries y Archibald, 2018; Han, 2019). Por ejemplo; en el sitio de infección, la respuesta evocada por el AS está relacionada con una brusca producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), prerequisite para la respuesta hipersensible (RH) local. La RH, que consiste en la muerte celular programada, interfiere con la alimentación y crecimiento de patógenos biótrosos sobre la planta hospedera. Sin embargo, este mecanismo de defensa no funciona con los necrótrofos debido a que se alimentan de los nutrientes extraídos de las células que ellos mismos destruyen (Thaler et al., 2004; Glazebrook, 2005).

El sistema inmunológico innato de las plantas hospederas es producto de su co-existencias con organismos patógenos y no patógenos. Principalmente, tal sistema inmunológico se divide en dos niveles jerárquicos interconectados, la inmunidad basal o inmunidad activada por patrones moleculares (PTI, por su significado en inglés *Pattern-Triggered Immunity*) y la inmunidad activada por efectores (ETI, por su significado en inglés *Effector-Triggered Immunity*). El primer nivel de defensa es el PTI e inicia con la percepción de inductores o patrones moleculares asociados a microbios

(PMAM) y asociados a daño (PMAD), derivados del hospedero, por parte de sus respectivos receptores transmembranales (Han, 2019). En la fase PTI se puede detener el avance de la colonización del patógeno, también es cuando la planta percibe la diferencia entre un organismo benéfico y un patógeno (Katagiri y Tsuda, 2010). Los patógenos exitosos que superan el PTI, secretan efectores o factores de virulencia que interfieren con componentes del sistema inmunológico suprimiéndolo, derivando en una susceptibilidad activada por efectores (ETS, por el inglés *Effector-Triggered Susceptibility*). Ulteriormente, las proteínas intracelulares polimórficas NB-LRR (llamadas así por sus dominios *Nucleotide Binding and Leucine Rich Repeats*) codificadas por los genes *R* de resistencia a enfermedades, reconocen directa e indirectamente a sus efectores correspondiente de forma específica, para que sobrevenga la ETI (Jones y Dangl, 2006).

Los genes de virulencia del patógeno que son reconocidos por los genes *R* de la planta, bajo la presión de la selección natural, pueden cambiar por mutagénesis (diversificación por polimorfismos en nucleótidos individuales [SNP] o pequeñas inserciones o deleciones [indels]), ser descartados o adquirirse nuevos efectores vía transferencia horizontal genética para evitar ser identificados y no activar la ETI (Karasov *et al.*, 2014). Bilateralmente, los genes *R* del sistema inmunológico de la planta presentan polimorfismos (mutaciones no sinónimas y deletéreas) y diversificación a través de duplicaciones, translocaciones, recombinaciones o arreglos cromosomales, para reconocer las nuevas y diferentes variantes de los factores de virulencia, y así reaccionar ante la respuesta defensiva nuevamente (Andersen *et al.*, 2018).

En contraste con los PMAM/D y sus receptores PRR, los efectores y sus receptores NLR cognados son hipermutagénicos al mantenerse bajo constante presión selectiva (Karasov *et al.*, 2014). La detección directa de los efectores y los PMAM sirven para la planta atacada como “señales no propias”, mientras que las moléculas blanco de los efectores y los PMAD funcionan como “señales propias modificadas” que activan la defensa. ETI es adecuadamente útil contra patógenos (hemi)biótros empero es limitadamente efectivo contra los necrótrofos (Laluk y Mengiste, 2010; Jones y Dangl, 2006).

2.2.1. Características de la inmunidad activada por patrones moleculares asociados a microbios y daño.

Los PMAM son señales químicas relativamente comunes con estructuras conservadas típicas de grandes grupos taxonómicos de patógenos, que han tenido cambios evolutivos muy lentos. La parte estructural mínima del patrón molecular o epítipo es suficiente para iniciar la respuesta inmune (Shamrai, 2014). Algunos de los PMAM producidos por patógenos biótropos y necrótrofos (bacterias, hongos, oomicetes y herbívoros) que se han caracterizados son la flagelina, factor de elongación Tu, peptidoglucanos, lipooligosacáridos, lectina y quitina de la pared celular, xilanasa, etc. Los PMAD son productos celulares de la planta hospedera derivados de la actividad enzimática y mecánica del patógeno, suelen ser fragmentos de la pared celular o de la cutícula, estos son oligogalacturonidos y monómeros de cutina, respectivamente. Otros PMAD son los péptidos señal, están los pequeños péptidos de ocho amino ácidos GmPep914 y GmPep890, los Pep1,2,3 y 4 (de ~23 amino ácidos), la sistemina (18 amino ácidos), nucleótidos o amino ácidos extracelulares, y glicopéptidos ricos en hidroxiprolina nombrados HypSys (Mengiste, 2012; Shamrai, 2014; Hou *et al.*, 2019). Localizados superficialmente en la membrana plasmática, cada PMAM/D tiene su receptor cognado PRR (del inglés *Pattern-Recognition Receptor*) correspondiente; estos son los receptores tipo cinasa (RLK, por el inglés *Receptor-Like Kinase*), las proteínas tipo receptor (RLP, por el inglés *Receptor-Like Protein*) y las cinasas RLCK (proveniente del inglés *Receptor-Like Cytoplasmic Kinase*). Un RLK prototipo consiste de un dominio extracelular, un dominio transmembranal y un dominio intracelular cinasa, en el caso de los RLP se diferencian por la carencia del dominio intracelular cinasa. En tanto que, los RLCK solamente constan del dominio cinasa, el cual pertenece en ambos receptores a la familia de cinasa RLK/Pelle. Debido a que carecen de dominio extracelular y transmembranal, los RLCK perciben indirectamente las señales al asociarse con otros receptores para formar complejos (Yang *et al.*, 2012; Han, 2019).

Varios PRR han sido estudiados, e.g. el receptor del epítipo flg22 de la flagelina FLS2, receptor de quitina CERK1/LysM, el de oligogalacturonidos WAK1, receptor BAK1 (implicado en la transducción de señales de los brasinoesteroides), receptor EFR del factor de elongación Tu bacteriano (EF-Tu) o su epítipo elf18, el receptor de la enzima hidrolítica fúngica xilanasa EIX2, y los receptores de los Pep1 y Pep2 llamados PEPR1

y PEPR2, respectivamente, entre otros receptores (Yang *et al.*, 2012; Mengiste, 2012). Aunque las plantas perciben distintos tipos de inductores vía sus receptores, las señalizaciones río abajo convergen en un mismo programa regulador inductor de PTI (Laluk y Mengiste, 2010). En ausencia de algún PMAM/D, BAK1 (un RLK) y BIK1 (*Botrytis induced kinase1*, un RLCK) pueden asociarse con diferentes PRR funcionando como co-receptores, BAK1 integra la señal de los receptores FLS2, EFR y PEPR1, igualmente BIK1 pero también de los receptores CERK1/LysM y BAK1 (Mengistere, 2012; Shamrai, 2014; Lal *et al.*, 2018).

En condiciones normales FLS2 está unido con BIK1, cuando FLS2 es activado por flg22 cambia su conformación e interactúa con miembros de la familia de las cinasas SERK (BAK1, SERK1, SERK2 y BKK1 [BAK1-LIKE1]), principalmente forma heterodímeros con BAK1 y BKK1. El complejo heterodimérico formado por los dominios extracelulares de FLS2 y BAK1 lleva a la proximidad sus dominios cinasa citoplasmáticos los cuales pueden fosforilarse uno a otro, posteriormente BIK1 es transfosforilado por FLS2 o BAK1, aunque también lo hace EFR (Mengistere, 2012; Yang *et al.*, 2012; Lal *et al.*, 2018). La fosforilación de BIK1 activa su traslado de la membrana plasmática hacia el núcleo para interactuar y transfosforilar (mecanismo conocido como phosphorelay) a los factores transcripcionales (FT) WRKY33, 50 y 57, los cuales se han visto implicados en la síntesis de AJ y AS. De esta manera, BIK1 incrementa los niveles de expresión de los genes de respuesta a AJ *PDF1.2* y AS *PR1*. Los niveles altos de *PR1* prevalecen sobre los de *PDF1.2* que caen a nivel basal 24 horas después de la infección con el hemibiótrofo *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (*Pst*) DC3000 (Lal *et al.*, 2018).

Otro componente esencial involucrado en la activación de PTI en respuesta a los PMAM/D es la cascada de fosforilación producida por tres módulos subsecuentes de proteínas cinasa, primero las MAPK (por el inglés *Mitogen-Activated Protein Kinase*) cinasa cinasas MAPKKK, luego MAPK cinasas (MKK) y por último las MAPK o MPK (Rao *et al.*, 2018). La respuesta a flg22, elf18 y nlp20 utiliza los módulos MAPKKK3/5-MKK4/5-MPK3/4/6 de la cascada de señalización (Yang *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2018). BIK1 no tiene ninguna función involucrada en la cascada de fosforilación de las MAPK. Sin embargo, PBL19/20/27/39/40, miembros de las PBS1-Like (PBL) que junto con BIK1 pertenecen a la subfamilia VII de los RLCK, median la activación de las MAPK en respuesta a quitina (Laluk y Mengiste, 2010; Krysan y Colcombet, 2018; Rao *et al.*,

2018). MKK3, activado por *Pst* DC3000, transfosforila a MPK1/2/7/14, a su vez inducen la expresión de los genes relacionados con la defensa *PR1*, *PR2*, *PR3*, *PR4*, *PDF1.2*, *LOX2* y *VSP1* (*VEGETATIVE STORAGE PROTEIN1*). De igual manera, MKK4/5 activan a MPK3/6, mientras que MKK1/2 activan a MPK4/6 (Dóczi *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2007).

Las MAPK tienen diferentes FT como blanco (ERF, WRKY, MYB o MYC) río abajo que controlan la expresión de genes relacionados a la defensa (Mengistère, 2012). En respuesta al necrótrofo *Botrytis cinerea*, el módulo MAPK3/6 transfosforila al FT ERF6 estabilizándolo para permitir la expresión de genes de defensa como *PDF1.2*. En el FT WRKY33 convergen varias señales, este al ser transfosforilado por MAPK3/6 activa la transcripción de genes requeridos para la biosíntesis y acumulación de la fitoalexina camalexina (Tsuda y Somssich, 2014). En condiciones óptimas, en el núcleo, WRKY33 forma un complejo ternario inhibidor con MAPK4 y MKS1 (MAPK SUBSTRATE1), que es disociado al ser transfosforilado MAPK4 por MKK1/2, y estos últimos a su vez por MEKK1 como respuesta a la flagelina (Krysan y Colcombet, 2018; Laluk y Mengiste, 2010). Aparte, el FT MYB44 activado por las MAPK3/6, se une al promotor y estimula la expresión de *WRKY70*. Si bien, el AJ induce la expresión de *MYB44*, río abajo, *WRKY70* controla de forma negativa la vía de señalización del AJ disminuyendo la transcripción de *PDF1.2*, *VSP1* y *AOS* (*ALLENE OXIDE SYNTHASE*), y de forma positiva la vía del AS induciendo la expresión de los genes *PR1*, *PR2* y *PR5* (Shim *et al.*, 2013; Tsuda y Somssich, 2014). No obstante se ha reportado que *WRK70* es activado por MAPK3/6 e induce la acumulación de AJ por medio de la sobre-expresión de los genes biosintéticos *LOX* y *AOS2* en respuesta al ataque del herbívoro masticador *Chilo suppressalis* (Li *et al.*, 2015).

La respuesta al herbívoro generalista *Spodoptera littoralis*, induce la expresión de los FT MYC2, MYB44, ERF13 y WRKY18/60 entre otros, siendo los dos últimos dependientes de COI1 o MYC2/3/4 y necesarios para esta misma respuesta al inducir la expresión de *VSP2* y reprimir a *PDF1,2* (Schweizer *et al.*, 2013; Phukan *et al.*, 2016). WRKY18/40/60 pueden formar en el núcleo heterodímeros y homodímeros entre ellos, que modulan la transcripción de los genes *PR1* de la vía del AS y *PDF1.2* del AJ (Xu *et al.*, 2006). WRKY18/60 reprimen la expresión de los genes *FMO1*, *PAD3*, *EDS1* y *CYP71A13* reguladores de la resistencia sistémica adquirida (RSA) evocada por AS. Pero también ambos regulan negativamente la expresión de los represores

transcripcionales JAZ8/10 (jasmonate ZIM-domain), por lo que se modula positivamente la expresión de los genes de respuesta a la vía de señalización del AJ, como los genes biosintéticos AOS y LOX2 (Brotman *et al.*, 2013; Phukan *et al.*, 2016).

2.2.2. Inmunidad activada por efectores.

El sistema inmunológico innato de las plantas controla la interacción con organismos benéficos (comensalistas o simbioses) y la respuesta defensiva a patógenos (Jones *et al.*, 2016). A pesar de que sean distintas estas interacciones, todas están influenciadas por la actuación recíproca entre los genes de avirulencia “*Avr*” (que codifican para los efectores) de los organismos interactuantes y los alelos de los genes de resistencia a enfermedades “*R*” de las plantas.

El sistema inmunológico de las plantas elaborado por los genes *R* extermina a los patógenos con genes de avirulencia no adaptados, seleccionando a los patógenos resistentes. Mutuamente, el repertorio de genes de virulencia perteneciente a tales patógenos coevoluciona mutando para que los efectores no sean reconocidos e invadan a las plantas hospederas, seleccionándose aquellas que se han adaptado (Uhse y Djamel, 2018). El término gen de avirulencia refiere a que el producto proteico carece de virulencia sobre el hospedero debido a que el gen *R* complementario es expresado, la virulencia es manifestada por los genes *Avr* cuando el hospedero no contiene los genes de resistencia *R* (McDowell y Woffenden, 2003). Esta interacción dio origen al concepto gen-por-gen, el cual es un modelo de ligando-receptor que activa el mecanismo de defensa ETI una vez sea reconocido el producto del *Avr* o efector por el receptor proteico *R* (Van der Biezen y Jones, 1998). Los efectores de diversos patógenos, sean hongos, oomicetos, insectos, bacterias, nematodos o virus, facilitan la colonización y patogénesis sobre la planta hospedera perturbando procesos fisiológicos o respuestas inmunológicas (Toruño *et al.*, 2016; Varden *et al.*, 2017).

La cantidad de efectores producidos por los patógenos es muy variable, por ejemplo, los hongos tienen cientos de genes candidatos para efectores, en comparación con las bacterias que tienen un número moderado (White y Jones, 2018). Estudios sobre el hemibiótrofo *M. oryzae* han demostrado que los hongos poseen dos vías distintas para la secreción de las proteínas efectoras, consistentemente los efectores se dividen en dos tipos según su localización dentro de la célula. Una son los efectores citoplasmáticos acumulados en el complejo interfaseal biotrófico (BIC por sus siglas en

inglés) que luego se secretan al citoplasma de la célula de la planta, incluye a Avr-Pita, Pwl1-4, Bas2 y Avr-Piz-T (Zhang y Xu, 2014). La interfase BIC es una estructura en forma de domo, asociada a regiones ricas en membrana plasmática y retículo endoplásmico (RE) derivados de la planta, que yace superficialmente fuera de la membrana plasmática y pared celular del hongo, inicialmente persiste en la punta de la hifa filamentosa especializada para la invasión (HI) primaria, luego su posición es subapical y se presenta de forma lateral en las HI secundarias bulbosas (Giraldo et al., 2013).

El traslado de los efectores citoplasmáticos fúngicos hacia BIC está ligado a una exocitosis no convencional e independiente al sistema secreción vesicular RE-Golgi. Los componentes proteicos Exo70, Sec3, Sec5, v-SNARE Snc1 y t-SNARE Sso1 acoplan el tráfico de vesículas secretoras para activar la exocitosis y acumulación de los efectores citoplasmáticos en BIC, los cuales después son trasladados al interior de la célula hospedera (Giraldo *et al.*, 2013; Zhang y Xu, 2014). Aunque los efectores citoplasmáticos tienen un patrón de aglomeración dentro de la membrana extra hifal invasiva (EIHM por sus siglas en inglés, es un compartimiento que rodea toda la HI y el BIC) preferencialmente se acumulan en el BIC y atraviesan la EIHM para ser secretados al interior de las células vivas hospederas. Mutantes Δ exo70 y Δ sec5 son ineficientes en la secreción de los efectores citoplasmáticos Pwl2 y Bas2 (Giraldo *et al.*, 2013). El otro tipo son los efectores apoplásticos, estos no entran a la célula hospedera y se distribuyen extracelularmente dentro del compartimiento inter-facial EIHM rodeando la HI entera. Mediante la vía de secreción vesicular convencional del RE-Golgi los efectores apoplásticos son secretados desde el interior de la hifa hacia la EIHM, el bloqueo del transporte vesicular entre RE-Golgi mediante el tratamiento farmacológico con brefendin A (BFA), retiene a los efectores apoplásticos como Slp1 y Bas4/113 en el RE del hongo.

Se ha visto que otro mecanismo de secreción que utiliza el citoesqueleto también está involucrado en la secreción de los efectores apoplásticos (Giraldo *et al.*, 2013). Hasta la fecha no está claro como los efectores apoplásticos son transferidos al interior de la célula hospedera y ni como son reconocidos por los receptores (Zhang y Xu, 2014).

Los efectores proteicos tienen diferente objetivo moleculares que modifican la homeostasis de diferentes hormonas para engañar el sistema inmunológico y aumentar la vulnerabilidad o susceptibilidad de la planta hospedera. El hemibiótrofo

bacteriano *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* sintetiza la toxina coronatina que mimetiza la bioactividad de JA-Ile para inducir la apertura de los estomas en la hoja y permitir la entrada del patógeno (Toruño *et al.*, 2016). Cepas de *P. syringae*, como pv. *tabaci*, no productoras de coronatina secretan (usando el sistema de secreción tipo III, T3SS) el efector cisteína proteasa HopX1 que degrada múltiples represores transcripcionales JAZ, independientemente de COI1, permitiendo la expresión de genes regulados por AJ y la reapertura estomatal (Gimenez-Ibanez *et al.*, 2014). Conservado en *P. syringae*, el efector (tipo T3SS) acetil transferasa HopZ1 específicamente acetila a las proteínas JAZ1/6 provocando su degradación, suprimiendo la defensa estomatal (Jiang *et al.*, 2013). Otros efectores de *P. syringae*, como HopM1, AvrB y HopF2, igualmente suprimen la inmunidad estomatal (Toruño *et al.*, 2016). El moho suave provocado por el oomicete biótrofo obligado *Hyaloperonospora arabidopsidis* secreta el efector HaRxL44 que causa la degradación de la subunidad 19a del Complejo Mediador, elevando los niveles de AJ que antagonizan los de AS para poder atacar a *Arabidopsis*, así considerándose a Med19a parte de la inmunidad (Toruño *et al.*, 2016). La ectomicorriza mutualista *Laccaria bicolor* necesariamente para la simbiosis produce la proteína efectora MiSSP7 que interactúa y estabiliza a JAZ6 de *Populus thricocarpa*, protegiéndola de la degradación y reprimiéndola transcripción de genes de respuesta a la vía de señalización del AJ (Plett *et al.*, 2014; Uhse y Djamel, 2018).

La bacteria hemibiótrofa *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) contiene el gen *xopH* que codifica para la proteína fosfatasa XopH, siendo su sustrato el fitato o *myo*-inositol-*hexakis*fosfato (InsP₆), principal compuesto de almacenamiento que contiene el 75% total del mineral fosfato en las semillas de cereales, legumbres y frutos secos (Blüher *et al.*, 2017; Buades Fuster *et al.*, 2017). XopH es un efector tipo T3SS con actividad de 1-fitasa que al degradar el fitato, desfosforilando el InsP₆ en el C1, produce inosito *pentakis*fosfato InsP₅ [1-OH]. En plantas de chile (*Capsicum annuum*) portadoras del gen de resistencia Bs7, se induce la respuesta hipersensible de manera indirecta a la identificación del propio XopH, debido a que Bs7 reconocer los cambios en los *myo*-inositol polifosfatos hechos por la actividad fitasa (Blüher *et al.*, 2017). La expresión de XopH reduce los niveles de inositol pirofosfato InsP₇ y InsP₈, que junto con este último e InsP₅ son requeridos como cofactores esenciales en el coreceptor COI1/JAZ para la percepción de AJ-Ile y la expresión de los genes de respuesta

(Sheard *et al.*, 2010; Laha *et al.*, 2015; Blüher *et al.*, 2017). La actividad fitasa de XopH incrementa la expresión de los genes *PR1b*, *PR4* y *PI-II* regulados por la vía de señalización del Et y AJ, accionando la resistencia contra patógenos necrótrofos, lo que el hemibiótrofo *Xcv* aprovecha para inicialmente dispersarse (Blüher *et al.*, 2017). Los efectores son reconocidos por los productos de los genes *R* que codifican las proteínas receptoras inmunológicas intracelulares NBS-LRR (sinónimo NLR) (del inglés, *Nucleotide-Binding Site and Leucine-Rich Repeats domains*) compuestas de dos dominios conservados, uno central tipo ARC (por su presencia en las proteínas APAF-1 [apoptotic protease-activating factor 1], de resistencia *R* y CED-4 [*Caenorhabditis elegans* death-4]) de unión a nucleótidos y otro de repeticiones ricas en leucina hacia el extremo C-terminal (Lai y Eulgem, 2018). En el extremo N-terminal los receptores NLR varían, principalmente pueden constar de un dominio CC (Coiled Coil) o de TIR (Toll-interleukin-1 receptor), aunque recientemente se ha caracterizado el dominio RPW8 que se asemeja al dominio CC, el cual mediante análisis filogenéticos se ha deducido que se originó *de novo* en las briofitas a partir de una región no codificante de un gen NBS-LRR, o probablemente por duplicaciones y posteriores acumulación de mutaciones del dominio CC (Zhong y Cheng, 2016). Otros dominios pueden presentarse en el extremo N-terminal abarcando a WRKY, SD (solanaceae domains) y BED (dedos de zinc de unión a DNA), igualmente en el extremo C-terminal se localizan otros dominios incluyendo MAPKKK, como en el caso de WRKY-TIR-NLR-MAPKKK (Meyers *et al.*, 2003). Interesantemente, los genes TIR-NBS-LRR no están presentes en monocotiledóneas pero son muy representativos en las dicotiledóneas, y los CC-NBS-LRR están en ambos (Lai y Eulgem, 2018).

2.3. Biosíntesis, señalización y respuesta del ácido jasmónico

Las plantas están expuestas a una plétora de estreses bióticos y abióticos. A través del ácido jasmónico, responden a condiciones adversas como agobio osmótico, sequia, heridas, ataques de herbívoros y patógenos necrótrofos (Farmer and Ryan, 1990; Turner *et al.*, 2002). El AJ también regula aspectos del desarrollo como la senescencia de la hojas, desarrollo de estambres, formación de tricomas, apertura de estomas e inhibición del crecimiento radicular (Ueda and Kato, 1980; Staswick *et al.*, 1992; Riemann *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2017). Los efectores patogénicos (como AvrB, HopX1 y HopZ1a) pueden accionar la señalización del AJ degradando a los

represores transcripcionales JAZ (jasmonate ZIM-domain) e iniciar la transcripción de genes de respuesta inmediatos a AJ (Turner *et al.*, 2002; Toruño *et al.*, 2016). La expresión de los genes biosintéticos de AJ, que van desde las lipasas hasta ACX, son regulados a sí mismo por el AJ, de tal manera que forman un circuito de retroalimentación positiva (**Fig. 2**). También los inductores (como quitina, oligosacáridos, oligogalacturónidos, sistemina o PEP1) inducen la biosíntesis del AJ al accionar la actividad de las lipasas tipo A₁, i.e. las galactolipasas GLA1, PLIP1-3 o las fosfolipasas DAD1, A- γ 3, PLA1, DGL y PLD (Wasternack y Hause, 2013; Wasternack y Strnad, 2018).

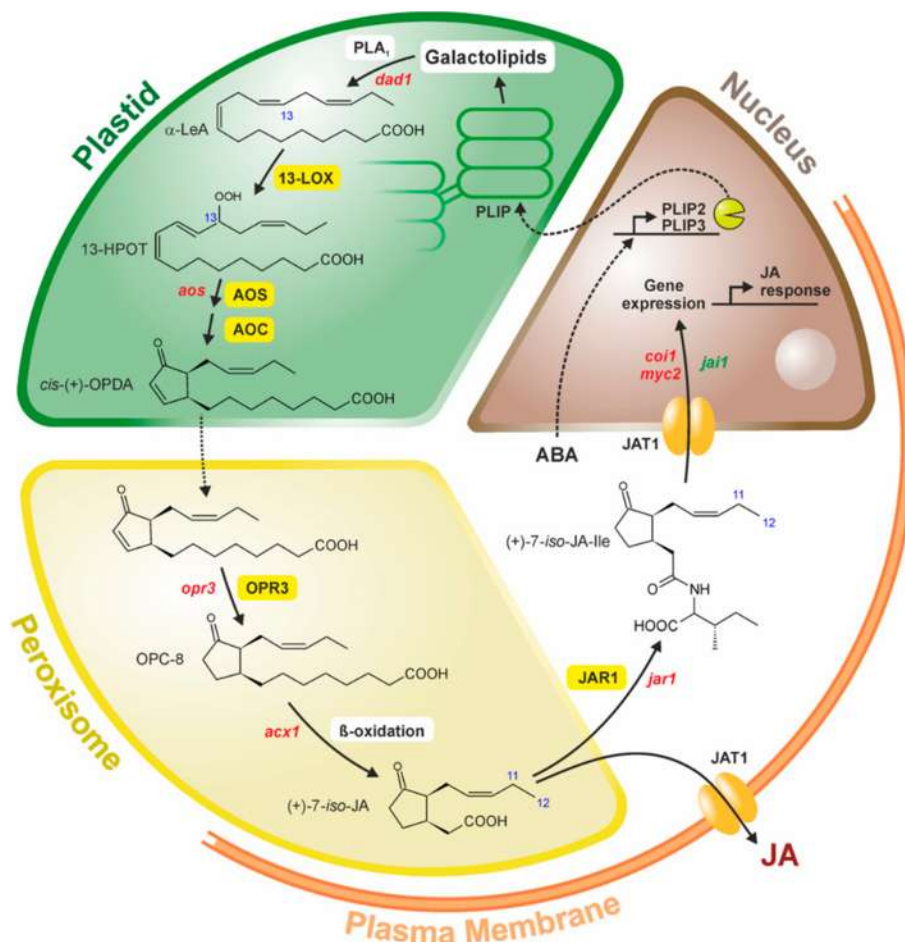


Figura 2. La biosíntesis del ácido jasmónico requiere de diferentes compartimentos celulares.

El ácido α -linolénico liberado por las fosfolipasas A₁ de los galactolípidos, es oxigenado por las 13-lipoxigenasas y ciclado en dos pasos por aleno óxido sintasa (AOS) y ciclase (AOC) formando cis-(+)-OPDA en los plástidos. El OPDA es transportado al peroxisoma para ser reducido por la OPDA reductasa 3 (OPR3) mediante la β -oxidación del ácido carboxílico de la cadena lateral para producir (+)-7-iso-JA. El cual es transferido al citoplasma para ser exportado por JAT1 o JAR1 puede conjugarlo con el aminoácido isoleucina para formar AJ-Ile, que también el producto puede ser importado por JAT1 al núcleo para iniciar la respuesta genética al AJ. Tomado de Wasternack y Strnad, 2018.

Siguiendo la vía octadecanoide, el ácido linolénico- α (α -LeA) es liberado por las lipasas de los substrato mono-galactosildiacilglicerol (MGDG), fosfatidilglicerol o fosfolípidos derivados de la membrana de los cloroplastos (Wasternack and Hause, 2013; Wasternack y Strnad, 2018; Ruan *et al.*, 2019). El carbono 13 del α -LeA (18:3) es oxigenado por las lipoxigenasas 13 (13-LOX2-4 y 13-LOX6, en *Arabidopsis*), produciendo el ácido 13-hidroperoxi-octadecatrienoico, 13-HPOT. Enseguida en el mismo átomo C 13, la enzima aleno óxido sintasa (AOS) cataliza una deshidratación que genera un epóxido inestable en el 13-HPOT, el cual es ciclado por la enzima aleno óxido ciclasa (AOC) formando el ácido 12-oxo-fitodienoico, OPDA (**Fig. 2**) (Turner *et al.*, 2002). Paralelamente, en el cloroplasto, las lipasas inician la vía hexadecanoide, en la que el ácido 11-hidroperoxi-hexadecatrienoico (16:3) o 11-HPHT, sigue la misma vía metabólica a través de AOS y AOC, originando el ácido dinor-12-oxo-fitodienoico (**Fig. 3**), acrónimo dnOPDA (Kienow *et al.*, 2008; Schaller y Stintzi, 2009; Chini *et al.*, 2018). Ambos, dnOPDA y OPDA son transportados al peroxisoma, donde OPR3 (OPDA reductasa 3) cataliza la reducción del anillo ciclopentanona del OPDA y del dnOPDA para producir ácido octanoico (OPC-8:0) y ácido hexanoico (OPC-6:0), respectivamente (Schaller y Stintzi, 2009).

Posteriormente, el extremo carboxílico de la cadena de ácido graso lateral de OPC-8 y OPC-6 es activado por la formación de un ester CoA catalizado por OPCL1 (OPC8:CoA ligasa 1) una acil-CoA sintetasa de ácidos grasos, produciéndose OPC-8-CoA y OPC-6-CoA (Kienow *et al.*, 2008). Subsecuentemente, en OPC-8-CoA y OPC-6-CoA se llevan a cabo tres o dos rondas de β -oxidaciones, respectivamente, por la cual dos carbonos son removidos por cada tanda. Estos pasos son catalizados por tres enzimas del peroxisoma, acil-CoA oxidasa (ACX), proteína multifuncional (MFP) y 3-ketoacil-CoA thiolasa (KAT), resultando en el penúltimo intermediario jasmonoil-CoA, del cual finalmente el (+)-7-*iso*-AJ es liberado por una acil-tioesterasa (**Fig. 2**) (Kienow *et al.*, 2008; Schaller y Stintzi, 2009). El AJ puede ser biosintetizado a través de una vía independiente a OPR3, en esta el OPDA directamente entra a la β -oxidación para producir dnOPDA, tnOPDA (tetranor-OPDA) y 4,5-ddh-JA (4,5-didehidrojasmonate), este último es reducido por OPR2 para elaborar AJ (**Fig. 3**) (Chini *et al.*, 2018).

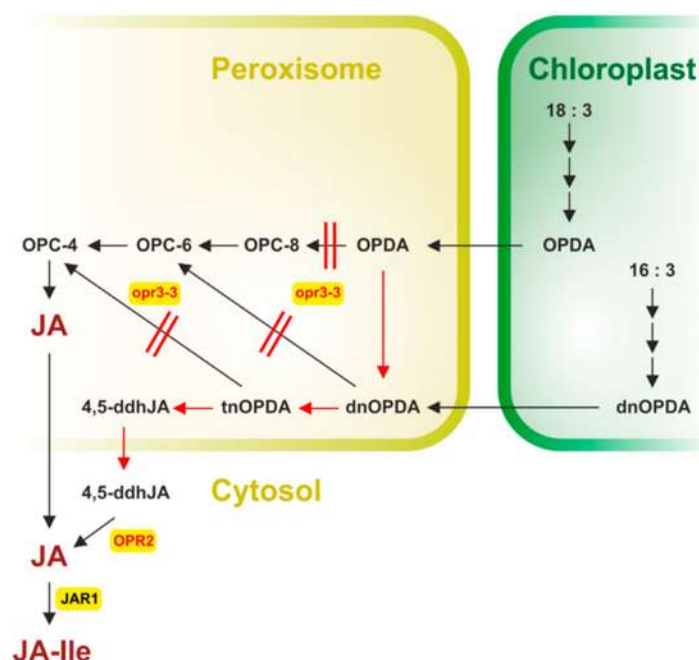


Figura 3. La vía indirecta a OPR3 para la biosíntesis de AJ. El OPDA es directamente reducido mediante la β -oxidación originando dnOPDA, que luego es reducido dos veces para dar tnOPDA y 4,5-ddhAJ, este último es liberado al citosol y reducido a AJ por OPR2. Las flechas negras indican la ruta canónica, y las rojas indican la función de OPR2 in la mutante *opr3-3*. Tomado de Wasternack y Strnad, 2018.

Seguidamente, el AJ es transferido al citoplasma, y es metabolizado en diferentes estructuras, tales como MeAJ (metil jasmonato), AJ-Ile (AJ-isoleucina), *cis*-jasmonoil, AJ-ACC (jasmonyl-1-aminocyclopropano-1-carboxylic acid) o 12-OH-JA (ácido 12-hidroxijasmónico) (Yan *et al.*, 2016). El gen *JMT* codifica para una carboxil metil-transferasa que cataliza la metilación del AJ obteniéndose MeJA, mientras que *JAR1* es una acil amino-ácido sintetasa (perteneciente a la familia GH3, Gretchen Hagen 3) que conjuga el AJ con isoleucina para bioactivarlo en formar de AJ-Ile (Staswick y Tiryaki, 2004; Kazan y Manners, 2008). Por otra parte, la molécula AJ-Ile es inactivada por su hidroxilación a 12-OH-AJ-Ile y carboxilación a 12-COOH-AJ-Ile, reacciones llevadas a cabo por las oxidasas citocromo P450 CYP94B1, CYP94B3 y CYP94C1 localizadas en el retículo endoplásmico, que de manera indirecta sintetizan 12-OH-JA al ser escindidas por las amidohidrolasas (IAR3 y ILL6). Un subgrupo de genes de la familia 2-oxo-glutarato oxigenasas nombrados (dependiendo de los autores) JASMONIC ACID OXIDASE (JAOS) o JASMONATE-INDUCED OXYGENASE (JOXS) específicamente hidroxilan JA para formar 12OH-JA directamente, la expresión de

estos genes es inducida por el AJ, heridas o infección del hongo *Botrytis cinerea* (Smirnova *et al.*, 2017; Caarls *et al.*, 2017).

Una vez biosintetizado el AJ-Ile, es transferido al interior del núcleo por el transportador JAT1/ABCG16 y es percibido por COI1 que es parte del complejo SCF^{COI1} E3 ubiquitina ligasa, integrado por un módulo catalítico de ubiquitina ligasa elaborada por Cul1-Rbx1, y otro módulo de reconocimiento de sustrato, formado por la proteína F-box CORONATINE INSENSITIVE 1 (COI1) unida a Skp1, capaz de reconocer distintas proteínas objetivo para su subsecuente degradación por el proteosoma 26S (Mosblech *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2017; Reitsma *et al.*, 2017). Inicialmente, el AJ-Ile percibido por COI1 forma el complejo binario COI1-JA-Ile, el cual sucesivamente interacciona con los represores transcripcionales JAZ (jasmonate ZIM-domain) para su ubiquitinación y posterior degradación vía proteosoma 26S, en este modelo propuesto por Yan *et al.*, (2018) mencionan que no hay interacción previa de las proteínas JAZ con COI, empero no toman en cuenta al cofactor InsP5. En cambio, otros trabajos consideran que los cofactores InsP5/8 promueven la interacción de COI1 con las proteínas JAZ formando un complejo coreceptor SCF^{COI1}-InsP5-JAZ *a priori* a la percepción de AJ-Ile. Al mismo tiempo, InsP5 favorece mecánicamente la unión de JA-Ile al complejo coreceptor COI1-JAZ. Entonces, la presencia del cofactor InsP5 configura una estructura que facilita la unión de AJ-Ile que sirve como un conector entre el complejo SCF^{COI1} y las proteínas JAZ (Sheard *et al.*, 2010; Mosblech *et al.*, 2011; Laha *et al.*, 2015).

Los represores transcripcionales JAZ se unen e inhiben la actividad de los factores transcripcionales MYC, cuando los represores transcripcionales JAZ son ubiquitinizados por la ubiquitina ligasa E₃ y ulteriormente degradados por el proteosoma 26S, los factores MYC se liberan de la represión y así se puede iniciar la expresión de genes de respuesta a AJ (**Fig. 4**). Entre los genes de respuesta a AJ se encuentran los genes de biosíntesis, señalización y represión del mismo AJ, realizándose circuitos de retroalimentación positivos y negativos que regulan la homeostasis de esta fitohormona. Así mismo se expresan los genes de defensa a organismos necrótrofos y herbívoros o de respuesta a estrés abiótico como heridas mecánicas (Wasternack y Strnad, 2018).

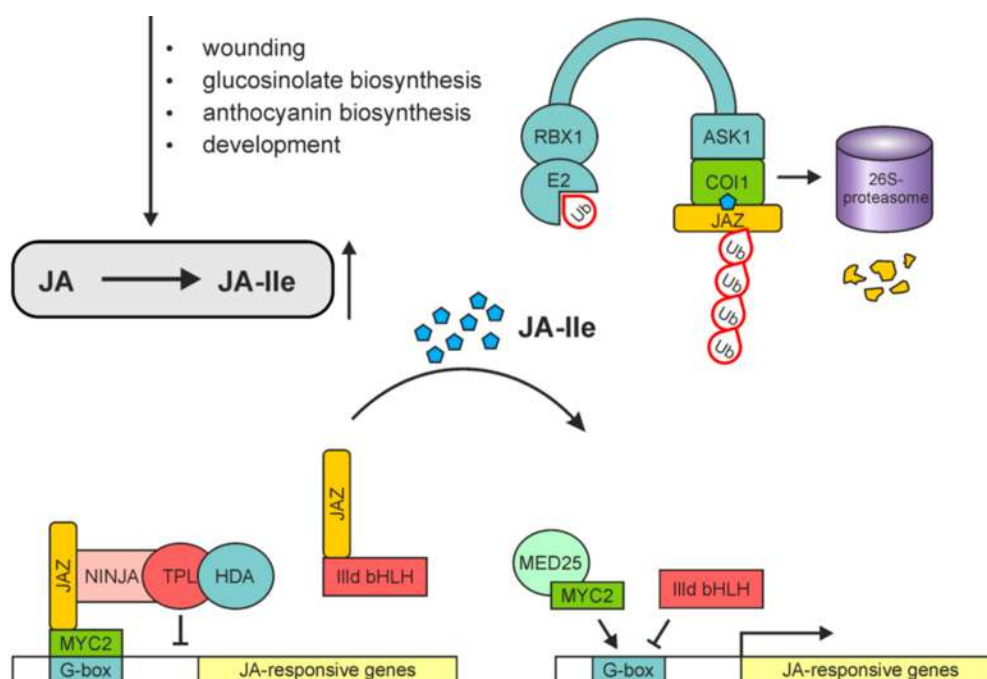


Figura 4. Percepción, señalización y activación de genes por parte del AJ. A bajos niveles de AJ, el complejo co-represor elaborado por las proteínas JAZ, NINJA, TOPLESS (TPL) y la histona desacetilasa (HDA), reclutan y reprimen tanto a reguladores positivos como negativos de la vía de señalización del AJ como el activador transcripción MYC2 o el represor transcripcional Ild bHLH. Después de algún estímulo externo o cambio en el desarrollo que eleve los niveles de AJ-Ile, este es percibido por el complejo co-receptor COI1-JAZ y degradado vía proteosoma 26S. Así, los genes de respuesta a AJ son activados por MYC2, que se asocia con la subunidad MED25 del complejo mediador para unirse al motivo G-box en *cis* de los promotores y activar la respuesta a AJ. Sin embargo el factor Ild bHLH antagoniza a MYC2 al competir por la unión al motivo G-box. Tomado de Wasternack y Strnad, 2018.

2.4. Biosíntesis, señalización y respuesta de las citocininas.

Las citocininas (CK), nombradas así por su habilidad de promover la citocinesis, son derivadas de adenina con cadenas laterales en el N^6 , pueden ser divididas en dos grupos basándose en la estructura de las cadenas laterales, a saber, aquellos con derivados de isopreno (predominantemente en plantas) y los otros con anillos aromáticos (El-Showk *et al.*, 2013). Las CK están involucradas en muchos aspectos del crecimiento y desarrollo, incluyendo división celular, crecimiento de la parte aérea, senescencia de la hoja, dominancia apical, toma de nutrientes, desarrollo vascular, entre otros. La *Trans*-zeatina (*tZ*) es la citocinina más abundante y bioactiva, aunque también existe en la forma *cis*-zeatin (*cZ*) con una actividad más limitada, las CK

pueden presentarse como ribósidos (con una ribosa unida al N^9) y ribótidos (donde el anillo de ribosa contiene un grupo fosfato) (Kieber y Schaller, 2014).

Las CK son biosintetizadas por la adición de un grupo prenil, derivado de dimetilalil-difosfato (DMAPP, producido a partir del metileritritol fosfato, MEP que se localiza en los plástidos), al N^6 del ATP/ADP para producir isopenteniladenina (iP) ribótidos, reacción catalizada por la enzima isopenteniltransferasa (IPT). En seguida, las enzimas citocromo P450 monoxigenasas (CYP735A1/2) hidroxilan los isoprenoides de los iP ribótidos, además son desfosforilados para producir *trans*-zeatina ribosido (El-Showk *et al.*, 2013; Kieber y Schaller, 2014; Kieber y Schaller, 2018). En seguida, las enzimas de la familia LONELY GUY (LOG, fosforibohidrolasas de citocinina nucleósido 5'-monofosfato) en un solo paso enzimático generan la forma activa de citocininas, i.e. la base libre isopentenil adenina iP y tZ, liberándose ribosa 5'-fosfato (Cortleven *et al.*, 2019). Menos entendida, es la biosíntesis de la *cis*-zeatina que utiliza el N^6 de la adenina del ARNt como aceptor del grupo prenil del DMAPP, reacción catalizada por la IPT, igualmente, la degradación realizada por LOG forma a cZ (Kieber y Schaller, 2018; Cortleven *et al.*, 2019).

Para mantener los niveles regulados de las CK, iP y tZ, son inactivadas de manera irreversible por las citocininas oxidasas (CKX) que escinden y separan la cadena lateral unida al N^6 de la adenina. Otra manera es la conjugación con azúcares (glucosa comúnmente), la O-glucosilación realizada por la O-glucosiltransferasa ocurre en el oxígeno de la cadena lateral N^6 de la zeatina o dihidrozeatina (dhZ), y puede ser revertida por la β -glucosidasa, entonces las CK O-glucosiladas actúan como almacenamiento de esta hormona (**Fig. 5**). Mientras que, las N-glucosilaciones en los N^7 y N^9 del anillo de purina son irreversibles, reacción llevada a cabo por las N-glucosiltransferasas. Interesantemente, Las O- y N-glucosilaciones, así como otras substituciones de los grupos funcionales en el anillo de purina, previenen la degradación de las CK por las CKX, incluso inhiben la unión con sus receptores cinasas de histidina, HK (Werner y Schmülling, 2009; Kieber y Schaller, 2014; Kieber y Schaller, 2018).

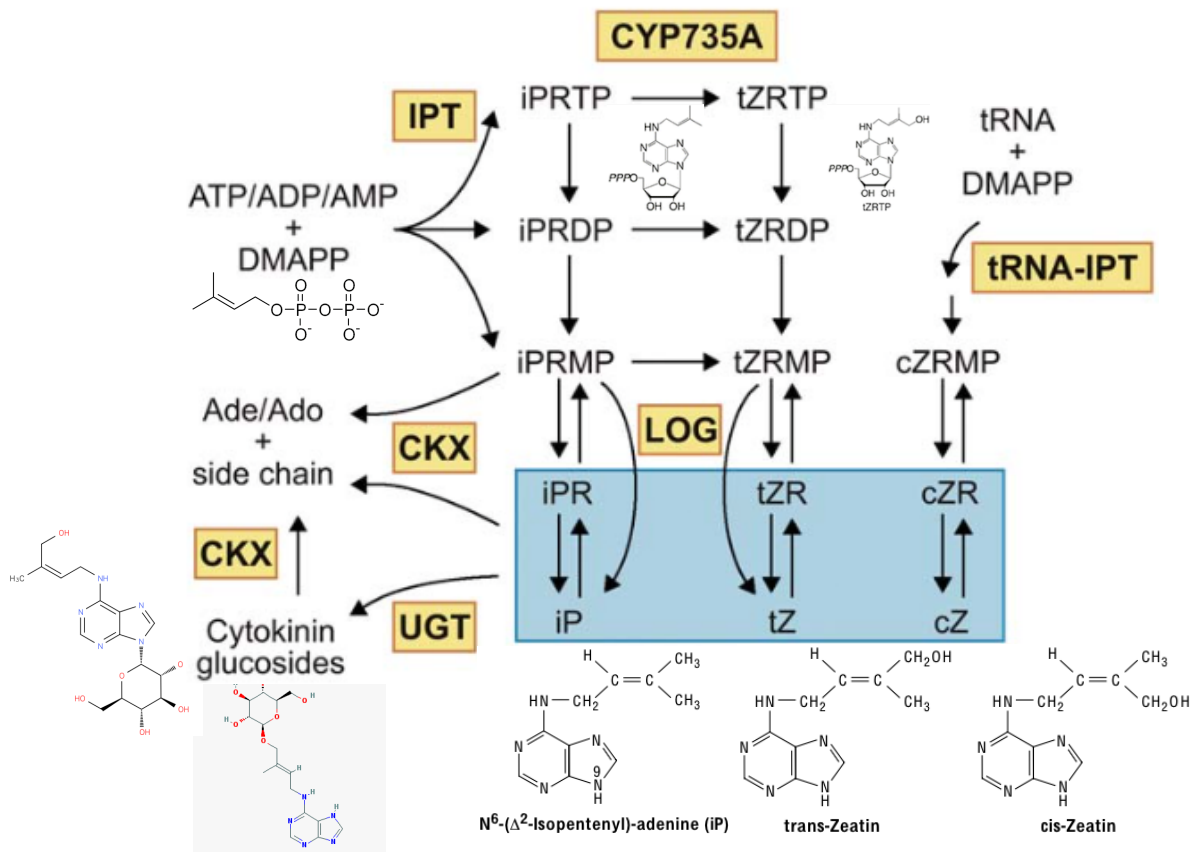


Figura 5. Metabolismo de las citocininas. Inicialmente, los iP ribótidos son producidos por la enzima isopenteniltransferasa (IPT), luego los CYP735A generan los tZ ribótidos. Por otra parte, las CK tipo cZ son elaboradas por la enzima IPT-tRNA. Los ribótidos tri y difosfatos de iP, tZ y cZ son desfosforilados por fosfatasas a iPRMP, tZRMP y cZRMP, los cuales son convertidos por la enzima LOG a las bases libres bioactivas. Las CK biológicamente activas, remarcadas en el cuadro azul, son inactivadas por las enzimas CKX o por su conjugación con azúcares a través de las glucosiltransferasas (UGT). Modificado de Werner y Schmülling, 2009.

Las CK son percibidas por la familia de receptores HK2, HK3, HK4 (también llamado CRE1 o WOL1), constan de un dominio de unión a CK extracitosólico CHASE (*Cyclasa/Histidina kinases-Associated Sensing Extracellular*), de al menos dos dominios transmembranales, y una región citosólica híbrida que contiene un dominio cinasa histidina, un dominio receptor divergido (sin función aparente) y un dominio receptor conservado en el extremo C terminal. En *Arabidopsis thaliana*, los receptores AHK se localizan en la membrana de retículo endoplásmico aunque un pequeño número de ellos se han encontrado en la membrana plasmática, el dominio CHASE se orienta hacia el lumen del RE o la parte extracelular de la membrana plasmática. La percepción de las CK por parte del dominio CHASE induce una autofosforilación en el

residuo de histidina conservado del dominio citosólico cinasa, la cual transfiere el grupo fosforilo al residuo conservado de aspartato del dominio receptor conservado. Después el grupo fosfato es transferido río abajo a la histidina conservada de las proteínas móviles AHP (*histidine-containing phosphotransfer*), las AHP se transportan del citosol al interior del núcleo y transfosforilan el residuo conservado de aspartato ubicado en el dominio receptor de los factores transcripcionales reguladores de respuesta (ARR) tipo B para activarlos. Los ARR tipo B se caracterizan además por un extremo C terminal largo que contiene un dominio de unión a ADN tipo Myb, con el que directamente activan la transcripción de los genes de respuesta a CK, entre los cuales están los ARR tipo A. En estos últimos, la señalización de CK fosforila el dominio receptor y los estabiliza, empero carecen del dominio de unión a ADN para la regulación transcripcional (**Fig. 6**).

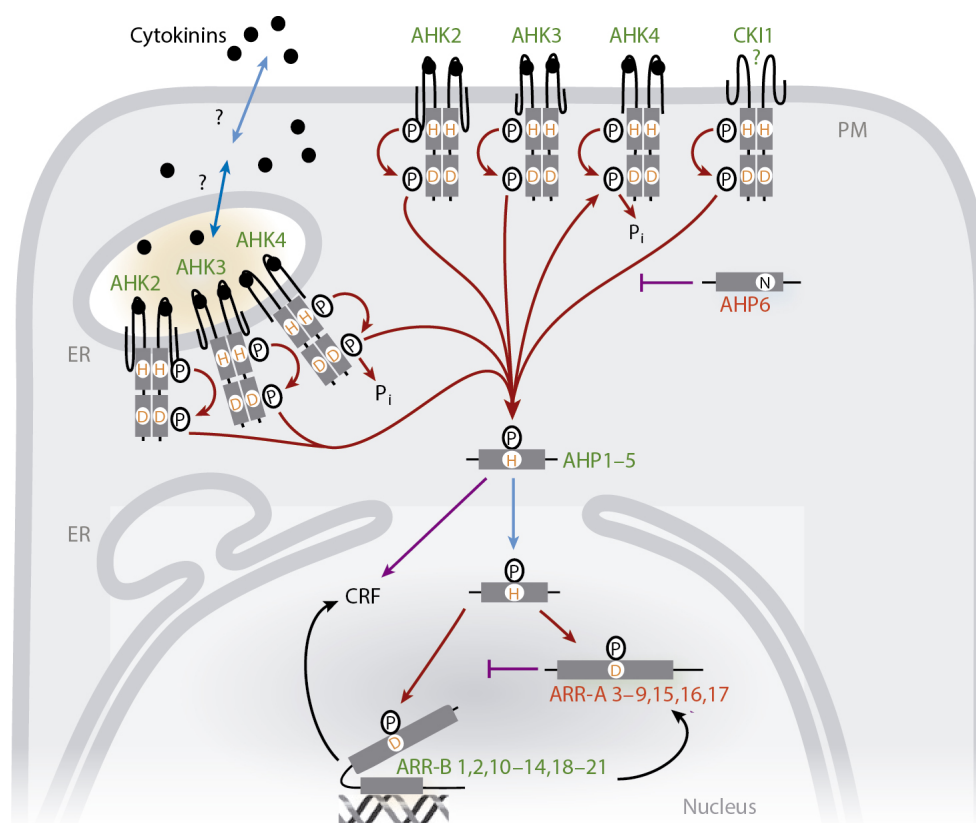


Figura 6. La señalización de las citocininas ocurre mediante el sistema de dos componentes. Al momento en que la CK es percibida por el dominio CHASE de sus receptores AHK localizados en las membranas del RE y plasmática. En los dominios citosólicos ocurre una autofosforilación en el residuo de histidina (H), enseguida este grupo fosforilo (P) es trasferido al residuo de aspartato (D) dentro de los mismo receptores. La señal de los diferentes receptores converge transfiriendo los grupo P a los residuos de histidina de los AHP (del 1 al 5) para mediar la transferencia de señal del citoplasma al núcleo. El grupo P pasa de la histidina del AHP al aspartato de los ARR nucleares, los ARR tipo B

regulan positivamente la vía de señalización de CK, activando transcripcionalmente los genes de respuesta a CK. Los ARR tipo A, directamente expresados por los tipo B, interfieren negativamente con la vía de señalización de CK, formándose un circuito de retroalimentación negativa. Localizada en la membrana plasmática, CKI posee actividad histidina cinasa constitutiva. AHP6 carece del residuo conservado de histidina y es incapaz de aceptar el grupo fosforilo, sin embargo, interfiere con la vía de señalización de CK compitiendo por la interacción con los ARR. La expresión del factor transcripcional CRF (Cytokinin Response Factor) es activada por los ARR tipo B, sucesivamente este también regula positivamente la expresión de los genes de respuesta a CK, formando un circuito de retroalimentación positiva. Adaptado de Hwang *et al.*, 2012.

Comparándolos, los RR tipo B son reguladores positivos de la vía de señalización de CK, en tanto que los tipo A son reguladores negativos ya que compiten por la fosforilación de HP e interaccionan con otras proteínas de manera dependiente a su fosforilación (Kieber y Schaller, 2014; Kieber y Schaller, 2018). Los RR tipo B están en la cima de la cascada transcripcional, activan los genes de respuesta inmediata a CK, incluyendo a los de retroalimentación tanto positiva y negativa como a factores transcripcionales adicionales que proveen especificidad en respuesta a esta hormona. Por ejemplo, los factores transcripcionales WUSCHEL y CRF (Cytokinin Response Factors) o los genes CKX, los RR tipo A, LOG2 y CYCD3 (Zubo *et al.*, 2017; Kieber y Schaller, 2018). La serie de transferencia del grupo fosfato entre las secuencia de histidina-aspartato-histidina-aspartato se la conoce como señalización fosforelay de pasos múltiples que al parecer evolucionó a partir de la señalización de dos componentes o TCS (por el inglés, *Two-Component Signaling*) de las bacterias (Pekárová *et al.*, 2016).

2.5. Descripción de *Arthrobacter agilis*.

Koch *et al.*, (1995) reclasificaron a *Micrococcus agilis* (Ali Cohen, 1889) hacia el género *Arthrobacter* como *Arthrobacter agilis* (*A. agilis*) en base a un análisis filogenético con el gen 16S ribosomal y a características fenotípicas, tales como tipo de peptidoglucanos en la pared celular, quinonas, ácidos grasos, contenido de G+C, forma celular, etc. Especies del género de *Arthrobacter*, durante el crecimiento exponencial, muestran forma de bastón mientras que en la fase estacionaria tienen forma de coco (Singh *et al.*, 2016). La actinobacteria no formadora de spora, *A. agilis*, se encuentra extensamente distribuida a través de diferentes clases de ecosistemas,

que van desde la corteza de árboles olmos en Irán (Alizadeh, 2017), sobre la superficie de algas marinas y en tapetes microbianos bénticos de lagos en la antártida (Rojas et al., 2009; Leiva et al., 2015), en el biofilm rosado formado sobre las rocas del desierto de Mojave, California, EUA (Eppard et al., 1996) e incluso se ha encontrado como formadora de pátinas rosadas responsables de la biodeterioración de las rocas de “Terme de Foro” en Pompeya, Italia (Tescari et al., 2018).

Posiblemente, *A. agilis* puede adaptarse a ecosistemas tan variables debido a que resiste condiciones con escasos nutrientes, cambia su forma de coco a células pequeñas dormantes tipo quiste, y a la amplia capacidad de elaborar distintos metabolitos (Solyanikova et al., 2017). El color rojizo de las colonias formadas por *A. agilis* es debido a la alta producción del carotenoide bacterioruberina (Fong et al., 2001). Se ha demostrado que *A. agilis* produce antibióticos, dándole ventaja competitiva contra otras bacterias (Rojas et al., 2009). La viabilidad de *A. agilis* no es afectada por las bajas temperaturas del clima antártico, ya que aumenta la abundancia de carotenoides incrementando la fluidez y estabilidad de la membrana plasmática, además protege de la radiación solar a este microorganismo no fotosintético (Dieser et al., 2010). Sorprendentemente, *A. agilis* tiene la capacidad de ser psicrotolerante, halotolerante y alcalófila (Fong et al., 2001; Tescari et al., 2018; Valencia-Cantero et al., 2007; Kanekar et al., 1998).

Se han elaborado los borradores de los genomas de diferentes cepas de *A. agilis*, a saber, de la cepa de *A. agilis* L77 aislada del lago sub-glacial Pangong en los Himalayas (India) y de otras dos denominadas *A. agilis* 4041 y 4042 provenientes de un suelo en el Oeste de Francia; las últimas dos con usos potenciales en la agricultura y descontaminación de suelos (Singh et al., 2016; Crovadore et al., 2018). En respuesta a las bajas temperaturas, la cepa L77 produce exopolisacáridos (EPS), junto con compuestos anticongelantes (ácidos orgánicos, azúcares, polioles y amino ácidos) que bajan la temperatura del punto de congelación y nucleación del hielo. También producen enzimas activas en frío (lipasa, amilasa, proteasa, chitinase y β -galactosidasa) que podrían solubilizar fosfato, zinc y producir amoníaco (Singh et al., 2016). En el genoma de la cepa L77 se identificaron genes condificantes para lipasa, quitinasa, amilasa, proteasa, β -galactosidasa, transporte de fosfato, proteínas de choque de frío y resistencia a metales pesados (Singh et al., 2016). Mientras que en Rusia, se encontró a la cepa de *A. agilis* Lush13 como componente de la microbiota

en la tierra de campo de Pushchino, Moscú (Solyanikova *et al.*, 2015). Y en Turquía se aisló la cepa *A. agilis* A17 de la tierra rizosférica de *Verbascum vulcanicum*, y se reportó que sintetiza la fitohormona auxina (AIA) (Ozdal *et al.*, 2017).

2.5.1. Compuestos volátiles orgánicos producidos por *Arthrobacter agilis* UMCV2 y efecto de la *N,N*-dimetil hexadecilamina (DMHDA) en plantas.

Buscando rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas (PGPR) con capacidad reductora de Fe(II) en suelos de Uruapan, Michoacán, se identificó la cepa *A. agilis* UMCV2 (Valencia-Cantero *et al.*, 2007). Asimismo, sea visto que *A. agilis* UMCV2 logra colonizar endofíticamente a *Medicago truncatula* (Aviles-Garcia *et al.*, 2016). Como otras PGPRs, *A. agilis* UMCV2 emite una plétora de COV (compuestos orgánicos volátiles), de los cuales, la dimetil-hexadecilamina (DMHDA) se ha encontrado como el principal compuesto bioactivo (Velazquez-Becerra *et al.*, 2011). En la mezcla de COV se identificaron otras moléculas relacionadas, dimetil-dodecilamina y dimetil-tetradecilamina, aunque estas tienen menor bioactividad (Velázquez-Becerra *et al.*, 2013; Orozco-Mosqueda *et al.*, 2015).

En *Medicago truncatula* y *Sorghum bicolor* crecidas sobre medios de cultivo *in vitro* con escases de Fe, la DMHDA y los COV de *A. agilis* inducen la estrategia I de adquisición de Fe, al aumentar la actividad Fe-reductasa y la acidificación del medio rizosférico para solubilizar Fe y así, incrementar la adquisición de Fe en las plantas (Castulo-Rubio *et al.*, 2015; Orozco-Mosqueda *et al.*, 2013). Interesantemente, la DMHDA protege a las plantas de microorganismos necrotróficos (*Botrytis cinerea*), hemibiotrofos (*Phytophthora cinnamomi*) y xilotrofos (géneros *Hipocrea* o *Fusarium*) (Velázquez-Becerra *et al.*, 2013; Orozco-Mosqueda *et al.*, 2015).

En plantas filogenéticamente distantes, incluyendo a *Medicago sativa*, *S. bicolor*, *Pinus devoniana* y *Arabidopsis thaliana*; la DMHDA modula la morfologénesis de la raíz primaria e invariablemente acorta su crecimiento y promueve la formación de raíces laterales, indicando que evolutivamente tiene una función conservada dentro del reino vegetal (Velazquez-Becerra *et al.*, 2011; Castulo-Rubio *et al.*, 2015; Valencia-Cantero *et al.*, 2015; Raya-González *et al.*, 2017). Por su alta bioactividad, el aminolípido DMHDA emitido como COV por *A. agilis* UMCV2, es la molécula de interés en nuestro grupo de investigación.

3. Justificación.

Las rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR) interaccionan y ayudan a estas a enfrentar diferentes tipos de estrés de manera directa e indirecta, por ejemplo, mediante la producción de compuestos difusibles y emisión de compuestos volátiles orgánicos (VOCs) incentivan a la planta en sus mecanismos de defensa como es la estimulación de la vía de señalización del ácido jasónico (AJ). Además, el AJ es una hormona cuya biosíntesis inicia bajo la percepción de condiciones hostiles tanto bióticas como abióticas, la respuesta al AJ activa la expresión de genes de defensa a patógenos necrótrofos, herbívoros masticadores y heridas mecánicas. La inducción de la vía de señalización del AJ interfiere con la homeóstasis de otras hormonas, principalmente con las que estimulan el crecimiento como las citocininas (CK), estableciéndose una interacción antagónica entre la defensa y el crecimiento de la planta.

Estudios previos han mostrado que el VOC *N,N*-dimetil hexadecilamina (DMHDA) emitido por algunas PGPR tiene diversos efectos sobre plantas, que incluyen la modulación del crecimiento de la raíz, la morfogénesis y activación de la vía de señalización del AJ. Sin embargo, se desconoce hasta qué punto estos efectos están relacionados, es decir, si la activación de la vía del AJ tiene la capacidad de modificar la morfogénesis de la raíz, si este es un efecto sistémico o local y si interacciona con la vía de señalización de las CK, aspectos que se busca entender con este trabajo.

4. Hipótesis.

El compuesto volátil orgánico *N,N*-dimetil hexadecilamina, influye sobre el crecimiento de la raíz interviniendo en la interacción antagónica entre el ácido jasmónico y las citocininas.

5. Objetivo general.

Caracterizar la influencia de la *N,N*-dimetil hexadecilamina sobre la interacción antagónica entre el ácido jasmónico y las citocininas durante el crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*.

5.1. Objetivos particulares.

- Evaluar el efecto de la aplicación de dimetil hexadecilamina y el ácido jasmónico sobre la expresión de genes regulados por las citocininas y su interacción antagónica durante el crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*.
- Analizar el efecto sistémico de la aplicación del ácido jasmónico en *A. thaliana* y observar los cambios en la respuesta a citocininas.

6. Resultados.

6.1. Capítulo I. The bacterial volatile dimethyl-hexa-decylamine reveals an antagonistic interaction between jasmonic acid and cytokinin in controlling primary root growth of *Arabidopsis* seedlings.

En este capítulo se presenta el artículo original de investigación, dirigido a la comunidad científica internacional. El cual fue publicado en *Protoplasma*, revista indizada en el *Journal Citation Reports* (JCR) con un factor de impacto de 2.63.

6.1. Capítulo I.

The bacterial volatile dimethyl-hexa-decylamine reveals an antagonistic interaction between jasmonic acid and cytokinin in controlling primary root growth of *Arabidopsis* seedlings

Ernesto Vázquez-Chimalhua¹ & León Francisco Ruíz-Herrera¹ & Salvador Barrera-Ortiz¹ & Eduardo Valencia-Cantero¹ & José López-Bucio¹ 

Abstract

Chemical communication underlies major adaptive traits in plants and shapes the root microbiome. An increasing number of diffusible and/or volatile organic compounds released by bacteria have been identified, which play phyto-stimulant or protective functions, including dimethyl-hexa-decylamine (DMHDA), a volatile biosynthesized by *Arthrobacter agilis* UMCV2 that induces jasmonic acid (JA) signaling in *Arabidopsis thaliana*. Here, we found that the growth repressing effects of both DMHDA and JA are antagonized by kinetin and correlated with an inhibition of cytokinin-related *ARR5::GUS* and *TCS::GFP* expression in *Arabidopsis* primary roots. Moreover, we demonstrate that shoot supplementation of JA triggers JAZ1 expression both locally and systemically and represses cytokinin-dependent promoter activity in roots. A similar effect was observed after cotyledon wounding, in which an increase of JA-inducible *LOX2::GUS* expression represses root growth, which correlates with the loss of *TCS::GFP* detection at the very root tip. Our data demonstrate that the bacterial volatile DMHDA crosstalks with cytokinin signaling and reveals the downstream antagonistic interaction between JA and cytokinin in controlling root growth.

Keywords *N-N*-dimethyl-hexadecylamine . *Arabidopsis thaliana* . Jasmonic acid . Cytokinin . Root growth

Introduction

The last decade evidenced the extraordinary richness of adaptive strategies of plants to survive and thrive in a world of declining resources and changing growth conditions, and the myriad of bacterial and fungal species inhabiting roots, the so-called core microbiome contribute to reinforce plant immunity and growth adjustments. Bacteria biosynthesize phytohormones, such as auxins and cytokinins (Etesami et al. 2014;

Kudoyarova et al. 2014), but also quorum sensing signals and volatile organic compounds (VOCs) that instruct either bacterial cells or their root hosts to strengthen symbiotic relationships that in the long term improve plant growth (Ryu et al. 2003, 2004; Ortiz-Castro et al. 2008, 2011).

Arthrobacter agilis, a plant growth-promoting rhizobacterium (PGPR) releases dimethyl-hexadecylamine (DMHDA), an amino lipid identified as part of the VOCs blend emitted by several bacterial species (Liu et al. 2008; Velázquez-Becerra et al. 2011, 2013; Orozco-Mosqueda et al. 2013; Hernández-León et al. 2015). Noteworthy, DMHDA re-configurates root architecture through repressing root apical dominance and improving branching and absorptive capacity in different plant species including *Arabidopsis* and Sorghum, and at the same time induces the mechanisms for iron acquisition, which results critical for photosynthesis (Velázquez-Becerra et al. 2011; Castulo-Rubio et al. 2015; Valencia-Cantero et al. 2015). At least in part, the growth inhibitory properties of DMHDA have been related to the activation of the jasmonic acid (JA) signaling pathway, which represses cell division and elongation in the *Arabidopsis* primary root (Raya-González et al. 2017).

Handling Editor: Peter Nick

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00709-018-1327-9>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

* Eduardo Valencia-Cantero
vcantero@umich.mx * José
López-Bucio
jbucio@umich.mx

¹ Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio A1', Ciudad Universitaria, C. P. 58030 Morelia, Michoacán, México

The phytohormones cytokinin (CK) and auxin (IAA) play synergistic and/or antagonistic roles during root morphogenesis. IAA promotes cell division, subsequently CK controls differentiation at the transition domain, located between the meristem and elongation zones (Moubayidin et al. 2009). At the root apex, the high IAA-low CK ratio is gradually inverted such that a low IAA-high CK concentration predominates in the transition zone and it seems to be a pre-requisite for active cell elongation (Sabatini et al. 1999; Fonouni-Farde et al. 2016). In contrast, antagonistic JA-CK relationship mediates leaf senescence in oat, sunflower, and rice (Naik et al. 2002; Liu et al. 2015). Assays on radish and zucchini cotyledons demonstrated that CK stimulates palisade cell division and JA inhibits this process (Stoyanova-Bakalova et al. 2007). Specifically at the root apex, both JA and CK antagonistically target the SCF E3-ubiquitin ligase complex, which mediates degradation of proteins by the 26S proteasome. In such case, KMD, an Fbox subunit, interferes with CK signaling via interacting physically with type-B ARR transcription factors and marking them for degradation, and thus *kmd* mutants with elevated CK levels show reduced size of root meristems (Kim et al. 2013).

In this work, we further analyze the effects DMHDA and JA response on CK signaling and its role in *Arabidopsis* primary root growth. We found that the growth repressing effects of either JA or DMHDA could be reversed by the addition of CK, and that by supplying JA specifically to the shoot or wounding the cotyledons, the JA signaling translocates to the roots where it represses CK-related gene expression, which correlates with growth repression. This research supports the critical role played by bacterial volatiles in the communication established with plants and fine-tuning growth and defense hormonal signaling.

Materials and methods

Plant material and growth conditions

Arabidopsis thaliana ecotype Columbia (Col-0) seedlings, reporter lines *LOX2::uidA* (Jensen et al. 2002), *JAZ1/TIFY10A-GFP* (Thines et al. 2007), *ARR5::uidA* (D'Agostino et al. 2000), and *TCS::GFP* (Müller and Sheen 2008). Seeds were disinfected with 95% (v/v) ethanol for 5 min, 20% (v/v) bleach for 7 min and washed five times with distilled water and stratified for 2 days at 4 °C. Seeds were grown on Petri plates containing agar solidified 0.2X MS (Murashige and Skoog Basal Salt Mixture; Sigma-Aldrich) medium and

placed into a Percival growth chamber with a 16 h light/8 h darkness photoperiod, light intensity of 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at 22 °C. Petri plates were placed vertically at 65° angle to allow root growth along the agar surface and unimpeded aerial growth of the hypocotyls. JA drops were prepared with 70 μL of 0.2X MS agar solidified medium and placed over a sterilized parafilm strip. *A. thaliana* cotyledons wounds were made with a sterilized needle 4 days after germination.

Chemicals

Kinetin (Kt), jasmonic acid (JA) and dimethyl-hexadecylamine (DMHDA) were purchased from Sigma-Aldrich and kept at 4 °C. Kt was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), JA and DMHDA were dissolved in ethanol. For controls, equal volumes of solvents were used as in the highest hormonal treatment.

Confocal microscopy

After growth on MS 0.2X agar-solidified medium, *A. thaliana* seedlings were transferred onto microscope slides and stained with 10 mg mL^{-1} propidium iodide solution for 30 s. Samples were analyzed separately using a confocal microscope (Olympus FV1200; Olympus Corp., Tokyo Japan). For propidium iodide, we applied a 568-nm wavelength argon laser for excitation and an emission window of 585–610 nm conditions, while GFP was detected at 488 nm excitation/ 505–550 nm emission.

Histological GUS staining analysis

A. thaliana seedlings were transferred to GUS staining solution (0.5 mg mL^{-1} 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide in 100 mM sodium phosphate, pH 7) and incubated at 37 °C in darkness. Stained seedlings were cleared and fixed with a solution composed by 0.24 N HCL in 20% methanol and incubated for 50 min at 62 °C. The solution was substituted by a solution composed of 7% NaOH (w/v) in 60% ethanol (v/v) for 20 min at room temperature. Successively, plants were dehydrated with ethanol treatment at 40, 20, and 10% (v/v) for 30 min, and fixed in 50% glycerol (v/v).

Root growth measurement and statistical analysis

A. thaliana primary root length was analyzed with a stereoscopic microscope (Leica, MZ6) and measured with a ruler. Four days after germination (dag), the seedlings were transferred to place their shoots over

agar drops containing the 0.2X MS base medium supplemented with JA, at this moment the root tip marked onto the petri dish and from this starting position the growth was measured every 24 h for 5 days, controls were supplied with ethanol only as the solvent. Similarly, after cotyledon wounding, the root tip was marked and growth measured every 24 h for 5 days. The data were statistically analyzed with an ANOVA test and Duncan's means separation test for multiple comparisons, different letters indicate statistically significant differences of means ($p \leq 0.05$). Representative images were taken with a Nikon D50 digital camera.

Results

Kinetin antagonizes repressing effects of dimethyl-hexa-decylamine and jasmonic acid on *Arabidopsis* primary root growth

Previous studies indicated that DMHDA represses growth of *A. thaliana* primary roots inhibiting both cell division and elongation and increases JA signaling (Raya-González et al. 2017). This effect was independent of auxin signaling, but the possible contribution of cytokinin signaling, another important phytohormone in controlling root growth, remains unknown.

To investigate if DMHDA or JA treatments could influence the CK response during primary root growth, *A. thaliana* WT (Col-0) seedlings were grown on media supplemented with DMHDA, JA, Kt, or a combination of these molecules, and the primary root length was measured 7 days after germination (dag). *A. thaliana* supplemented with 16 μ M DMHDA or 4 μ M JA showed a roughly 70% inhibition of growth when compared to solvent treated seedlings. Interestingly, both DMHDA and JA repression of root growth could be reverted by Kt supplementation (Fig. 1). These results indicate an antagonistic interaction between DMHDA and JA with CK on primary root growth.

Dimethyl-hexadecylamine and jasmonic acid inhibit cytokinin-dependent promoter activity in *Arabidopsis* primary roots

To understand the antagonistic interaction between DMHDA and JA with CK on primary root growth repression, transgenic plants harboring CK-inducible gene constructs were used to monitor *ARR5::GUS* and

TCS::GFP promoter activity, because the steady-state levels of RNA for both are elevated very rapidly by cytokinin (D'Agostino et al. 2000; Müller and Sheen 2008). The plants were grown in media supplemented with the solvent only or with DMHDA and JA and the activity of the promoters monitored via histochemical analysis of GUS expression or GFP fluorescence using a confocal microscope. As expected, plants grown under standard conditions evidenced a cytokinin response in the proto-vasculature and root cap (Fig. 2a and d; Fig. 3a and d).

Interestingly, seedlings supplemented with DMHDA and JA at concentrations that inhibit root growth had decreased CK-related promoter activity when compared to solvent treated seedlings (Fig. 2a–f; Fig. 3a–f). Indeed, the primary root became wider at the concentrations of DMHDA tested, which may be due to altered periclinal and radial cell divisions or to an increase in cell growth. These results suggest that DMHDA represses primary root growth via inducing the JA response, which blocks CK-signaling.

Shoot application of jasmonic acid systemically represses *A. thaliana* primary root growth

JA application mimics herbivore attack or mechanical wounds (Henkes et al. 2008; Zhang and Baldwin 1997) and it is thought to systemically move to undamaged leaves to influence gene expression (Stratmann 2003; Sato et al. 2009; Koo et al. 2009). Currently, whether shoot-derived JA is able to target the roots to influence cytokinin signaling is unknown. With this in mind, we examined the effects of JA application on *A. thaliana* WT (Col-0) shoots on primary root growth in 4-day-old seedlings, whose cotyledons were transferred over drops of agar-solidified 0.2X MS medium supplemented or not with 64 or 128 μ M JA. Within the first 24 h after 128 μ M JA treatment, there was a systemic inhibition of primary root growth, which became more pronounced after 48 h onwards. We also observed growth reduction in plants whose shoots were transferred to drops containing 64 μ M JA, but at latter time. At the fifth day, root growth was inhibited 20% and 10% with respect to the control, at 128 μ M and 64 μ M JA, respectively (Fig. 4). Thus, JA application in shoots inhibits root growth in a concentration and time-dependent manner.

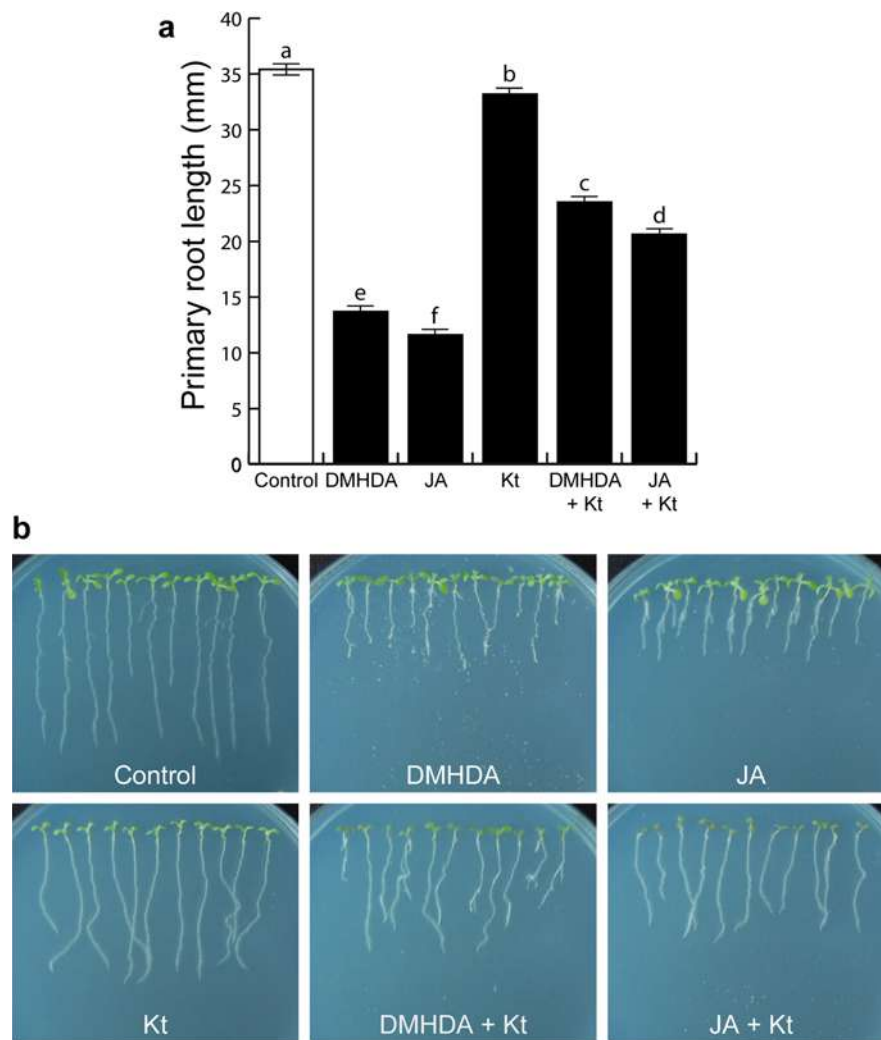


Fig. 1 Cytokinin supplementation alleviates the growth repressing effects of jasmonic acid (JA) and dimethyl-hexadecylamine (DMHDA) in *Arabidopsis* primary roots. **a** Primary root length of *Arabidopsis* WT (Col-0) seedlings grown for 7 days after germination (dag) in agar-solidified medium supplemented with 4 μ M JA (JA), 16 μ M DMHDA, 1 μ M kinetin (Kt) and the concentrations of the bioactive molecules in combination. **b** Representative images of plants in control conditions or supplemented with the different bioactive compounds. The graph shows the means $\pm$ standard errors, $n = 18$. Different letters are used to show means that statistically differ ($p \leq 0.05$). the experiment was repeated three times with similar results.

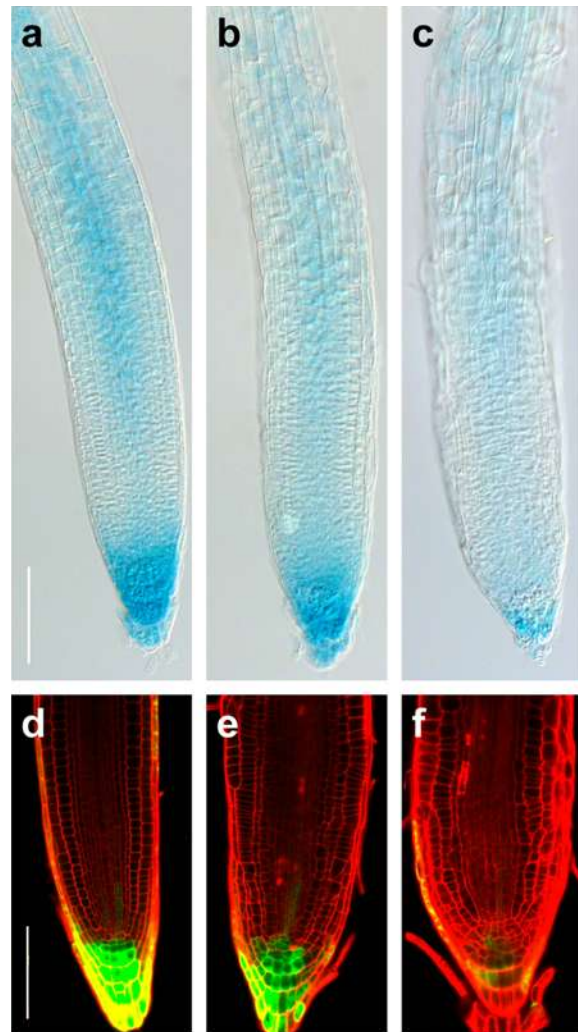
Application of jasmonic acid in the shoot promotes the local and long distance JAZ1 expression to stem and roots

JAZ1 acts in the early JA-wound response (Chung et al. 2008). *JAZ1/TIFY10A-GFP A. thaliana* reporter line was analyzed to investigate local and systemic effects of JA. Transgenic *Arabidopsis* seedlings expressing *JAZ1::JAZ1:GFP:uidA* were transferred at day 4 after germination so that their cotyledons were laid on drops of 0.2X MS medium supplemented with JA and GFP expression in cotyledons was analyzed via confocal microscopy at 0, 12, and 24 h after transfer. In medium without JA, GFP expression could be specifically observed in nuclei of stomatal guard cells but it was

absent in surrounding epidermal cells (Fig. 5a–g) and this expression pattern remained at 12 and 24 h (Fig. 5b and c). Twelve hours after shoot contact with drops supplemented with 64 μ M JA, GFP expression in cotyledons was upregulated in guard cells and in surrounding epidermal cells, and was exacerbated at 128 μ M JA (Fig. 5e and h). Twenty-four hours after contact, 64 μ M JA increased the *JAZ1* expression domain similarly to the 128 μ M level at 12 h (Fig. 5f). These results show that upon a JA stimulus is perceived in the shoot, *JAZ1* is rapidly induced in a dose and tissue-specific manner in cotyledon epidermal cells (Supplementary fig. 1), and was able to translocate from cotyledons to the hypocotyl as early as 24 h (Supplementary fig. 2). Moreover, *JAZ1* expression

could be detected in epidermal cells, cortical cells, and in vasculature of seedlings whose cotyledons received the JA stimuli for 24 h (Fig. 6a–i). These data indicate that shoot application of JA rapidly activates *JAZ1* gene expression in distant plant tissues including the stem and roots, where it likely orchestrates cell division and elongations programs.

Fig. 2 Dimethyl-hexadecylamine inhibits cytokinin responsive gene expression. **a–c** *ARR5::GUS* and **d–f** *TCS::GFP* expression in 7-day-old *Arabidopsis* transgenic seedlings germinated under standard growth conditions (**a**, **d**) or in media supplemented with 8 μ M (**b**, **e**) and 16 μ M (**c**, **f**) dimethyl-hexadecylamine. GUS staining of *ARR5* expression (**a–c**). Confocal micrographs in (**d–f**) show *TCS::GFP* fluorescence and propidium iodide countersatin. Representative images from 15 individuals per treatment are shown. The experiment was repeated three time with similar results. Scale bar: 100 μ m.



Shoot-derived jasmonic acid signaling represses cytokinin responsive promoter activity in *Arabidopsis* primary roots

The *TCS::GFP* *A. thaliana* CK reporter line was utilized to test the antagonistic interaction between systemic JA signal derived from the shoot in contact with drops supplemented with JA, and the CK response was monitored in the primary root apex. Seedlings were exposed to JA drops during 0, 12, and 24 h and GFP expression was monitored via confocal microscopy. In plants in contact to the drops without JA, CK *TCS::GFP* marker was strongly observed in the primary root cap (Fig. 7a–g) and remained similar at 12 and 24 h (Fig. 7b and c), but at 12 and 24 h of shoot contact with drops supplied with JA at 64 μ M and 128 μ M, *TCS::GFP* expression was systemically downregulated (Fig. 7e and h; Fig. 7f and i). These results confirm at the molecular level that shoot-derived

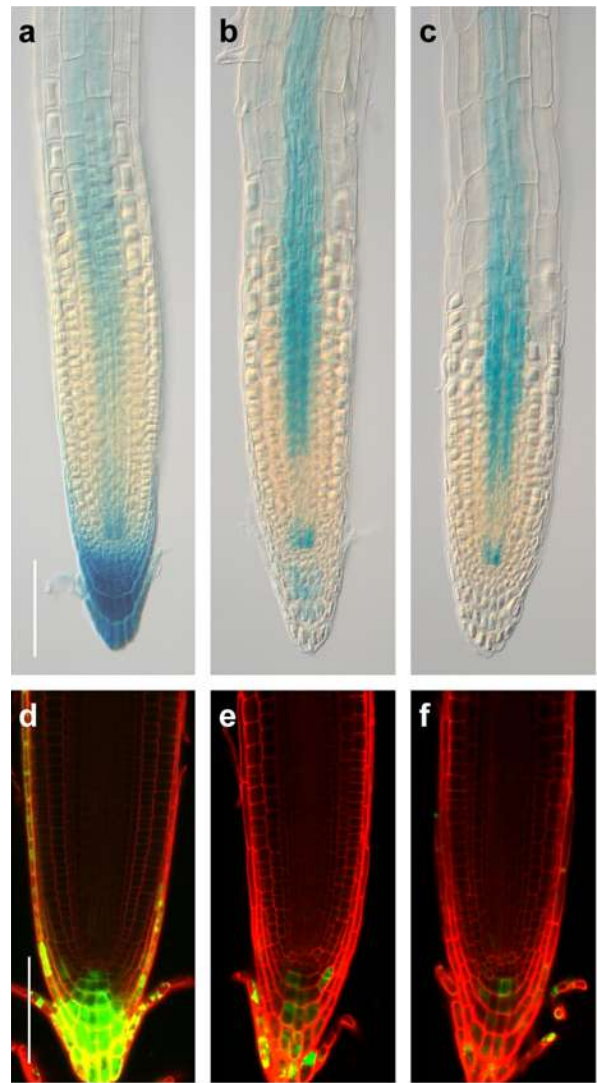
JA targets the very root tip, where it represses CK signaling.

Wounding represses *Arabidopsis* primary root growth through repressing cytokinin signaling

Physical damage to leaves, wounding or herbivory locally induces de novo JA biosynthesis, which inhibits growth (Zhang and Turner 2008). Now we investigated how wounding of *A. thaliana* cotyledons could affect root growth. In 4 dag *A. thaliana* seedlings, JA biosynthetic *LOX2::uidA* reporter gene was upregulated from 3 h after wounding of cotyledons and this induction remained until 24 h (Fig. 8a). Then, the cotyledons of *A. thaliana* Col-0 seedlings were wounded and primary root length was measured every 24 h until 120 h. Repression of growth was observed 48 h onwards and at the end of the experiment the root length decreased ~ 25% when compared to seedlings

without cotyledon damage (Fig. 8b). Consistently, CK response gene marker *TCS::GFP* was systemically downregulated in the primary root apex when cotyledons are wounded (Supplemental fig. 3). These results are consistent with the notion that JA is involved in systemic wound response, and antagonizes CK response, which leads to root growth inhibition.

Fig. 3 Jasmonic acid (JA) inhibits cytokinin responsive gene expression. **a-c** *ARR5::GUS* and **d-f** *TCS::GFP* expression in 7-days-old *Arabidopsis* transgenic seedlings germinated under standard (control) growth conditions (**a-d**) or in media supplemented with 8 μ M (**b, e**) and 16 μ M (**c, f**) JA. GUS staining of *ARR5* gene expression (**a-c**). Confocal micrographs in **d-f** show GFP fluorescence and propidium iodide counterstain. Representative images from 15 individuals per treatment are shown. The experiment was repeated three times with similar results. Scale bar: 100 μ m.



Discussion

PGPR produce and emit a vast VOCs repertoire that interfere with the hormonal balance of the host, for example, DMHDA has been reported for rhizobacteria that establish beneficial relationships with plants, in which it apparently acts as a quorum-sensing compound and plays ubiquitous functions such as primary root growth inhibition in phylogenetically distant plant species (Velázquez-Becerra et al. 2011; Castulo-Rubio et al. 2015; Valencia-Cantero et al. 2015). A recent study characterized several DMHDA-related amines with varied length of the fatty acid moiety and found that they affect basic cellular programs in *Arabidopsis* primary roots, including cell division and elongation. Indeed, DMHDA enhanced the expression of the JA-responsive gene marker *pLOX2::GUS*, while JA-related mutants *jar1*, *coi1-1*, and *myc2* affected on JA biosynthesis and perception, respectively, were compromised in DMHDA

responses, which indicates that the volatile can induce JA biosynthesis and requires components of this signaling pathway for bioactivity. In this previous report, detailed analysis of auxin-regulated gene expression, root architectural changes in WT, and auxin-related mutants *aux1-7*, *tir1/afb2/afb3*, and *arf7-1/arf19-1* indicated that DHDMA sensing acts in an auxin independent signaling manner (Raya-González et al. 2017).

Auxin and cytokinins regulate almost every aspect during the reconfiguration of the root system architecture. Both of them influence cell division, elongation, and differentiation during root growth, but the possible interaction between DMHDA and JA acting downstream with the cytokinin signaling pathway was not previously investigated. Since DMHDA is a natural bioactive substance whose levels may determine cross-kingdom-plant-bacteria relations, and JA is well known as a molecule

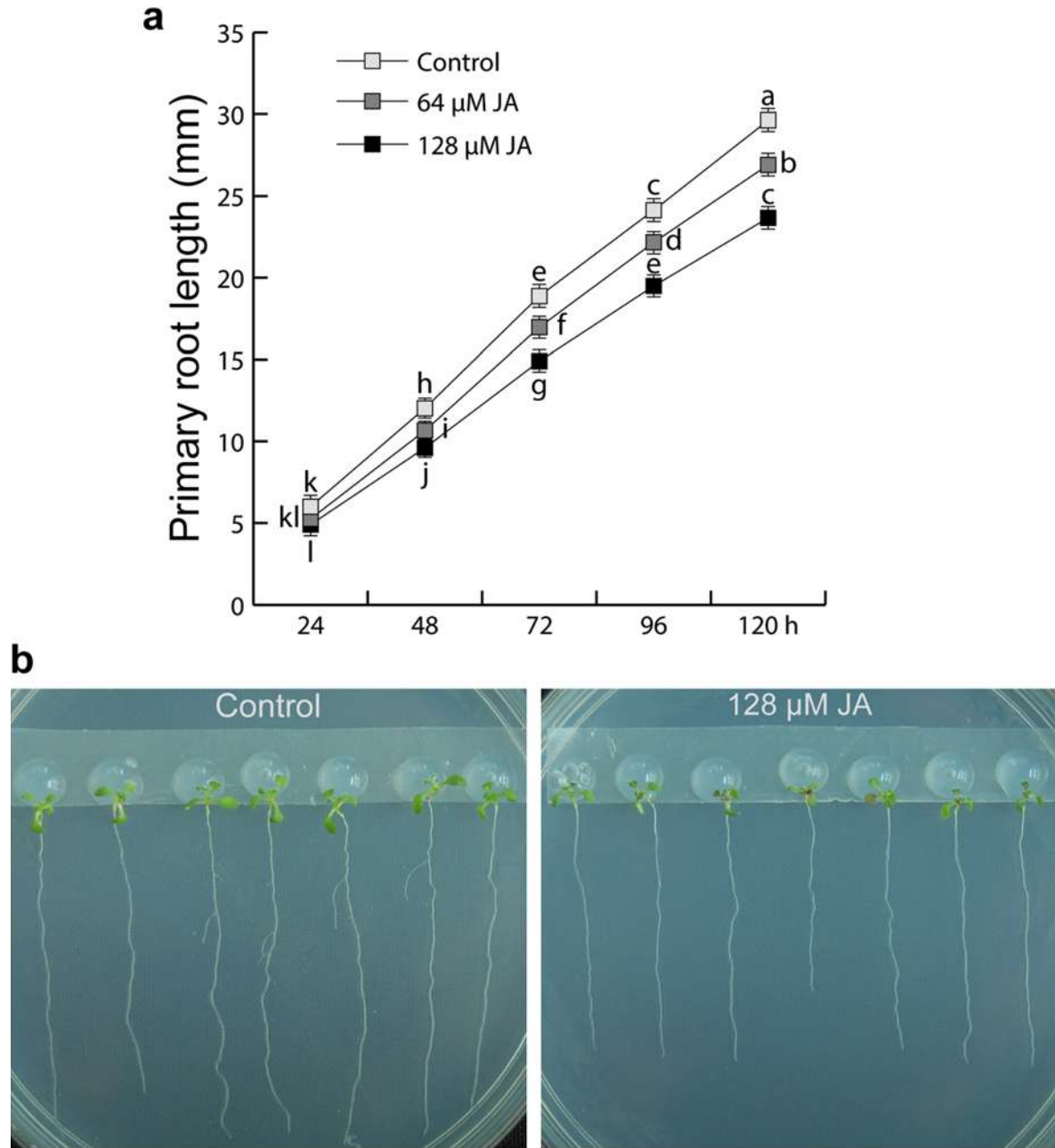


Fig. 4 Shoot-derived jasmonic acid (JA) represses *A. thaliana* primary root growth. Wild-type (Col-0) *A. thaliana* seeds were germinated and grown for 4 d on 0.2X MS medium and then transferred and grown to plates with fresh media for 5 d with their shoots placed over 0.2X MS drops supplemented with ethanol (control), 64 μ M JA or 128 μ M JA. **a** Growth kinetics of primary roots after transfer to the treatments, **b** representative images of plants after 5 days of growth in control conditions and 128 μ M JA drops treatments. Note that shoot contact with the drop of medium with high JA concentration repress growth of primary roots. Error bars represent SD from 30 seedlings and differences at $p < 0.05$. The experiment was repeated twice with similar results.

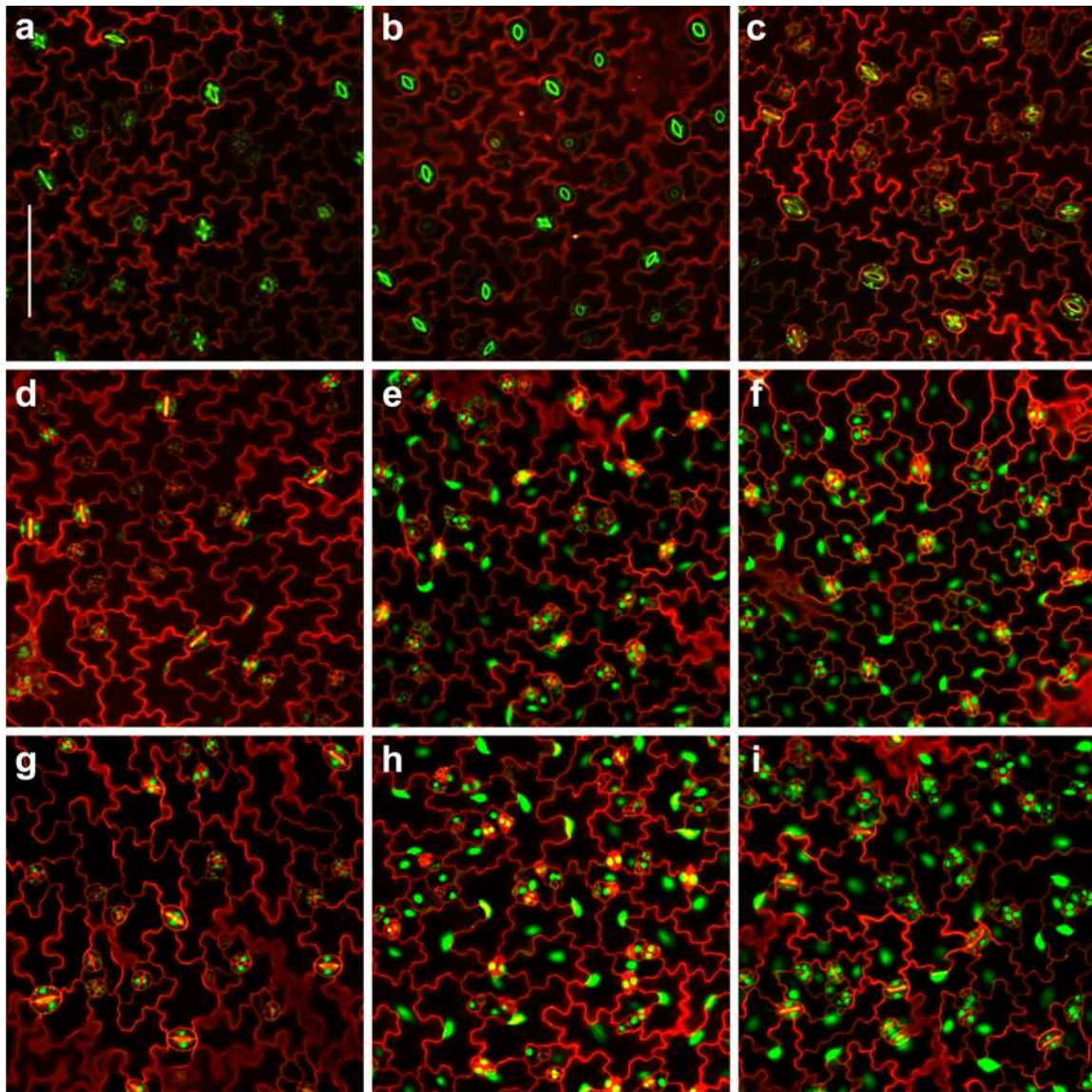
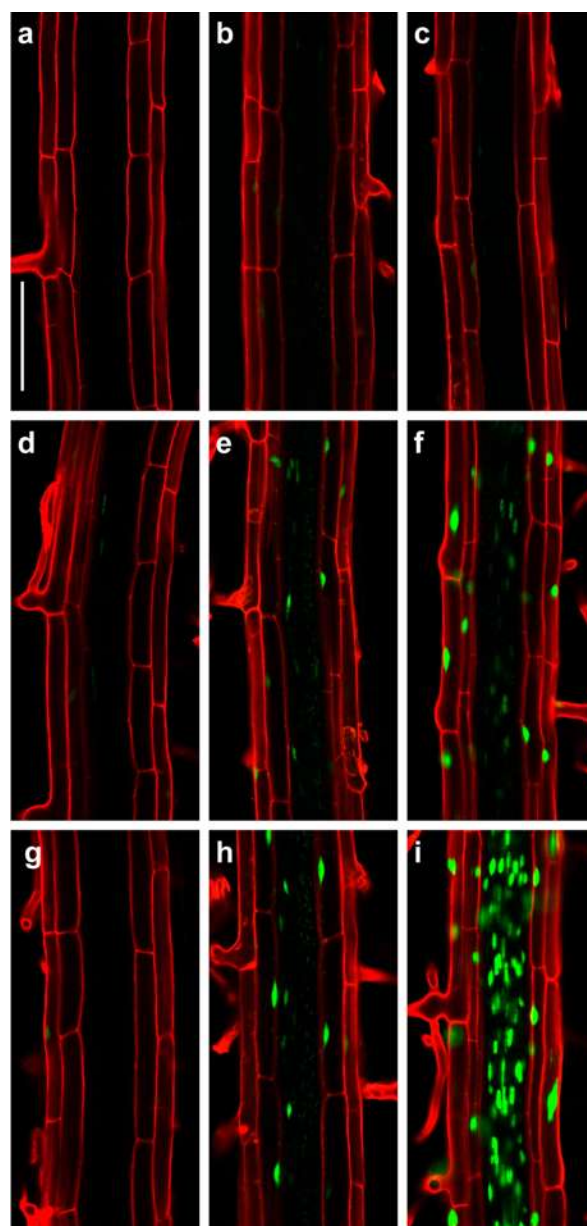


Fig. 5 Jasmonic acid (JA) induces *JAZ1* expression in epidermal cells of *Arabidopsis* cotyledons. Seeds from transgenic *Arabidopsis* seedlings harboring the *JAZ1/TIFY10A-GFP* construct were germinated and grown for 4 d on 0.2X MS medium and then transferred to plates with fresh media with their shoots placed over the surface of 0.2X MS drops supplemented with ethanol (a–c), 64 μ M JA (d–f), or 128 μ M JA (g–i), at 0 h (a, d, g), 12 h (b, e, h), or 24 h (c, f, i). The seedlings were incubated with propidium iodide, and confocal micrographs were recorded in cotyledons (scale bar = 100 μ m). Note that shoot contact with the drop of medium supplemented with JA increases *JAZ1* expression in nuclei from epidermal cells. Representative images are shown from at least 15 seedlings. The experiment was repeated twice with similar results

controlling plant defense, growth and defense trade-offs may be fine-tuned via crosstalk with cytokinin signaling. With this premise, combined application of DMHDA and JA with cytokinin was performed and growth of *A. thaliana* primary roots was assessed. Interestingly, growth inhibition by JA and DMHDA not only could be related to a downregulation of expression of CK response genes, but also CK supplementation could normalize root growth in plants exposed to the volatile and JA together. These data suggest that DMHDA and JA act to repress CK signaling in the Arabidopsis primary root.

Application of JA to the shoot mimics the effects of wounding or herbivory, since it is a messenger during plant adaptation to biotic challenges (Henkes et al. 2008; Zhang and Baldwin, 1997). Thus, we investigated the possible antagonism interaction of JA with CK using a systemic approach in which only the shoots of *A. thaliana* seedlings were laid on drops of medium supplemented with 64 μ M and 128 μ M of JA, whereas the roots grew over medium lacking JA. Shoot supplemented of JA inhibited primary root growth, which correlated with *JAZ1* upregulation both in cotyledons, stems and primary roots. *JAZ1* expression could be observed in nuclei of stomatal guard cells and in surrounding epidermal cells in response to JA. Concomitantly, CK-response in the primary root cap clearly was downregulated by contact of cotyledons with drops supplemented with JA. It appears that JA from cotyledons is progressively translocated to other tissues such as the stem and root. Recently, JA transporters were identified in *A. thaliana*, including JAT1 (an ABC family transporter) and GTR1 (a glucosinolate transporter) (Li et al. 2017; Ishimaru et al. 2017). It is possible that JAT1 as well as GTR1 could be involved in the translocation of accumulated JA from shoot to the roots to balance growth and defense.

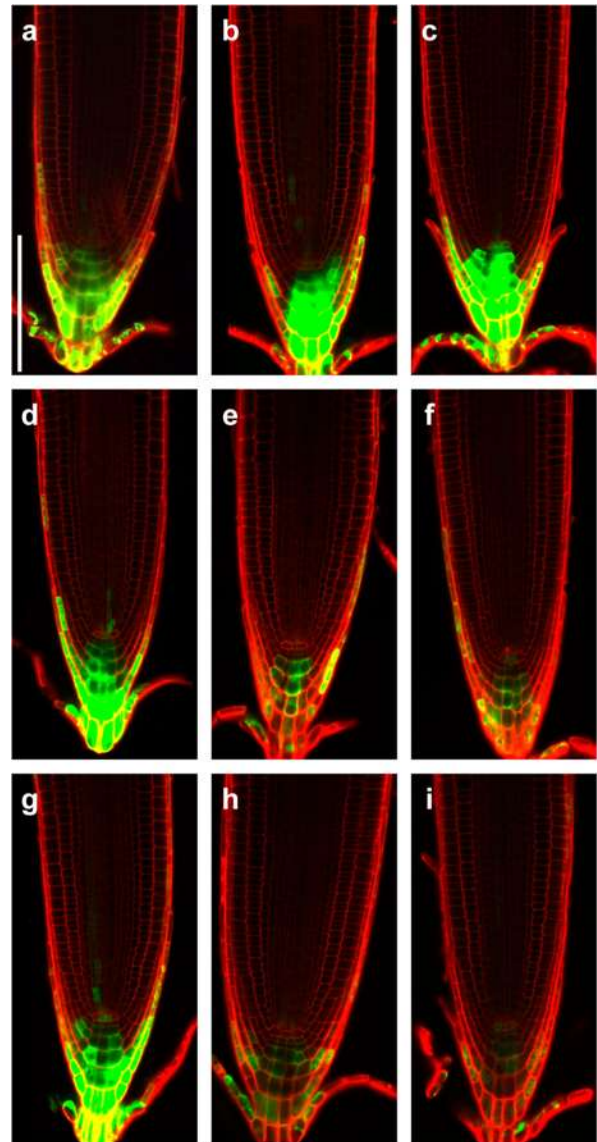
Fig. 6 Leaf-derived jasmonic acid (JA) systemically induces *JAZ1* expression in *A. thaliana* primary roots. Seeds from transgenic Arabidopsis seedlings harboring the *JAZ1::TIFY10A::GFP* construct were germinated and grown for 4 d on 0.2X MS medium and then transferred to plates with fresh media with their shoots placed over the surface of 0.2X MS drops supplemented with ethanol (a–c), 64 μ M JA (d–f), or 128 μ M JA (g–i) for 0 (a, d, g), 12 h (b, e, h), or 24 h (c, f, i). The seedlings were incubated with propidium iodide, and confocal micrographs of the expression pattern were recorded in roots (scale bar = 100 μ m). Note that shoot contact with the drop of medium supplemented with JA increases *JAZ1* expression in nuclei of most root tissues. Representative images are shown from at least 15 seedlings analyzed. The experiment was repeated twice with similar results.



Thus, we propose that upon DMHDA perception, the rising levels of JA moves to the root, where it repress cytokinin signaling, and thus inhibits cell division and elongation as previously reported (Raya-González et al. 2017). To confirm the latter premise, mechanical wounds were made with a needle in the cotyledons of 4-day-old Arabidopsis seedlings, and this treatment diminished root growth from day 2 onwards. The induction of JA biosynthesis could be demonstrated via an increase in expression of *LOX2::GUS*, which was upregulated as early as 3 h after wounding and this was sufficient to repress CK signaling at the very root tip, which increased with time. Taken together, our data provide conclusive evidence that a volatile compound from rhizobacteria can influence two plant canonical

pathways, on a first sight DMHDA increases JA biosynthesis and signaling and on the other hand, it targets cytokinin signaling in roots. Thus, by means of chemical communication major adaptive traits in plants are reinforced by the root microbiome.

Fig. 7 Shoot-derived jasmonic acid (JA) systemically represses cytokinin responsive gene expression in roots. Seeds from transgenic *Arabidopsis* seedlings harboring the *TCS::GFP* construct were germinated and grown for 4 d on 0.2X MS medium and then transferred and grown to plates with fresh media with their shoots over the surface of 0.2X MS drops supplemented with ethanol (a–c), 64 μ M JA (d–f), or 128 μ M JA (g–i) for 0 (a, d, g), 12 h (b, e, h), or 24 h (c, f, i). The seedlings were incubated with propidium iodide, and confocal micrographs of the expression pattern in roots were recorded (scale bar = 100 μ m). Note that shoot contact with the drops of medium supplemented with JA decreases *TCS::GFP* in collumela cell layers of the primary root. Representative image are shown from at least 15 seedlings analyzed. The experiment was repeated twice with similar results.



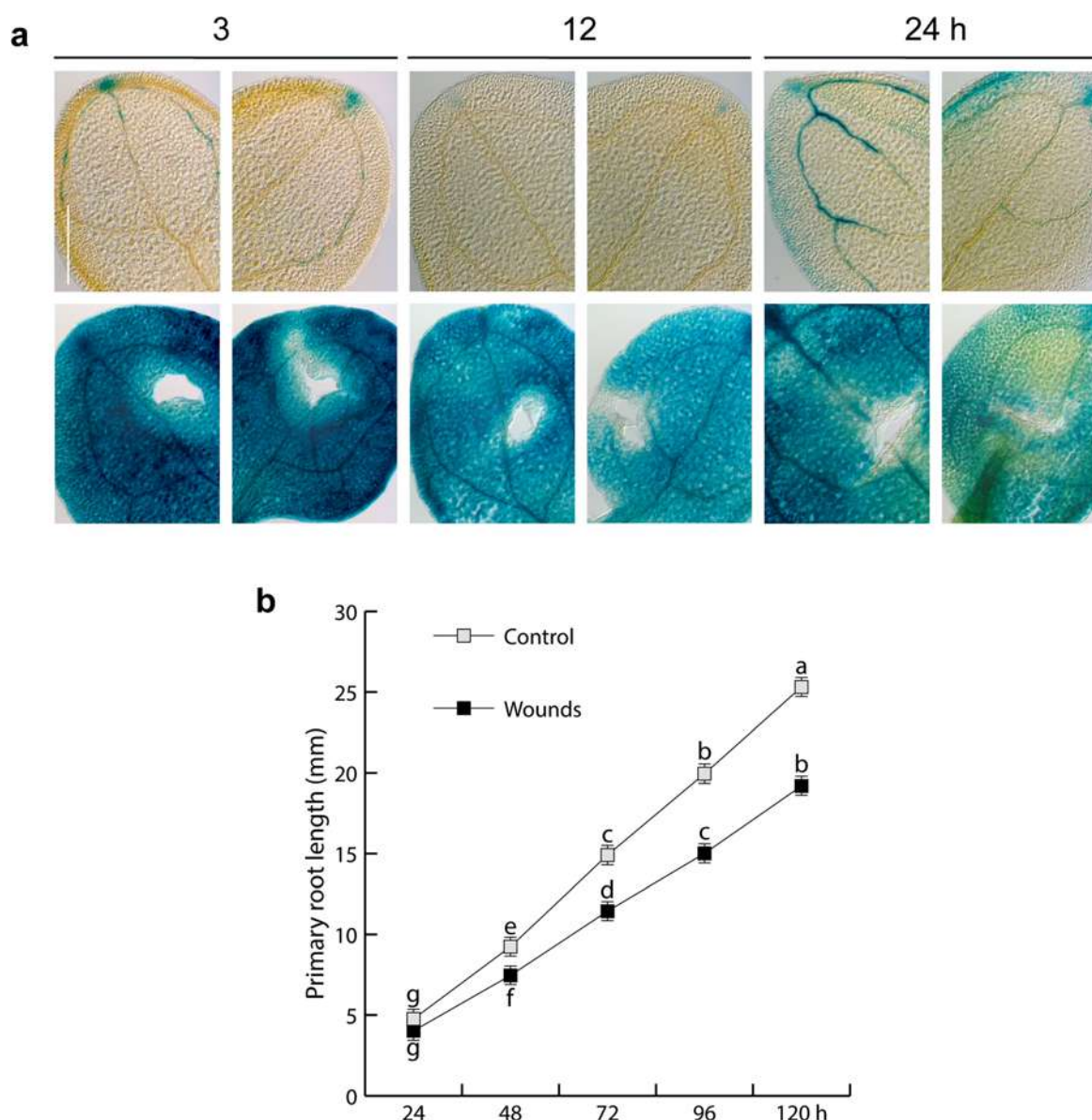


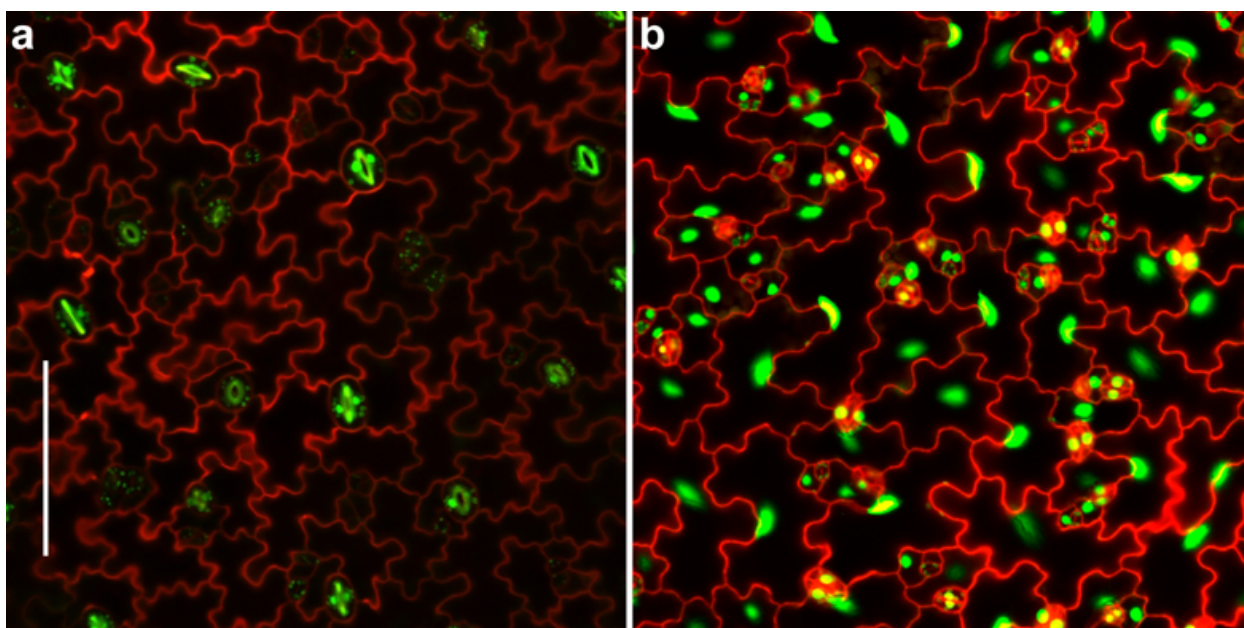
Fig. 8 Wounding of cotyledons locally induces *LOX2:GUS* and systemically represses *Arabidopsis* primary root growth. Wild-type (Col-0) seeds were germinated and grown for 4 d on 0.2X MS medium and the two cotyledons were wounded with a sterilized nail. **a** Representative images of *LOX2:GUS* expression in control plants (upper panels) and wounded cotyledons (lower panels). **b** Growth of primary roots after cotyledon wounding. Note that cotyledon wounding systemically represses growth of primary roots. Error bars in **b** represent SE from 60 seedlings and different letters indicate statistical differences at $p < 0.05$. The experiment was repeated twice with similar results

Funding information The Coordinación de la Investigación Científica UMSNH (México) funded this work via projects 2.22 (EVC) and 2.26 (JLB).

References

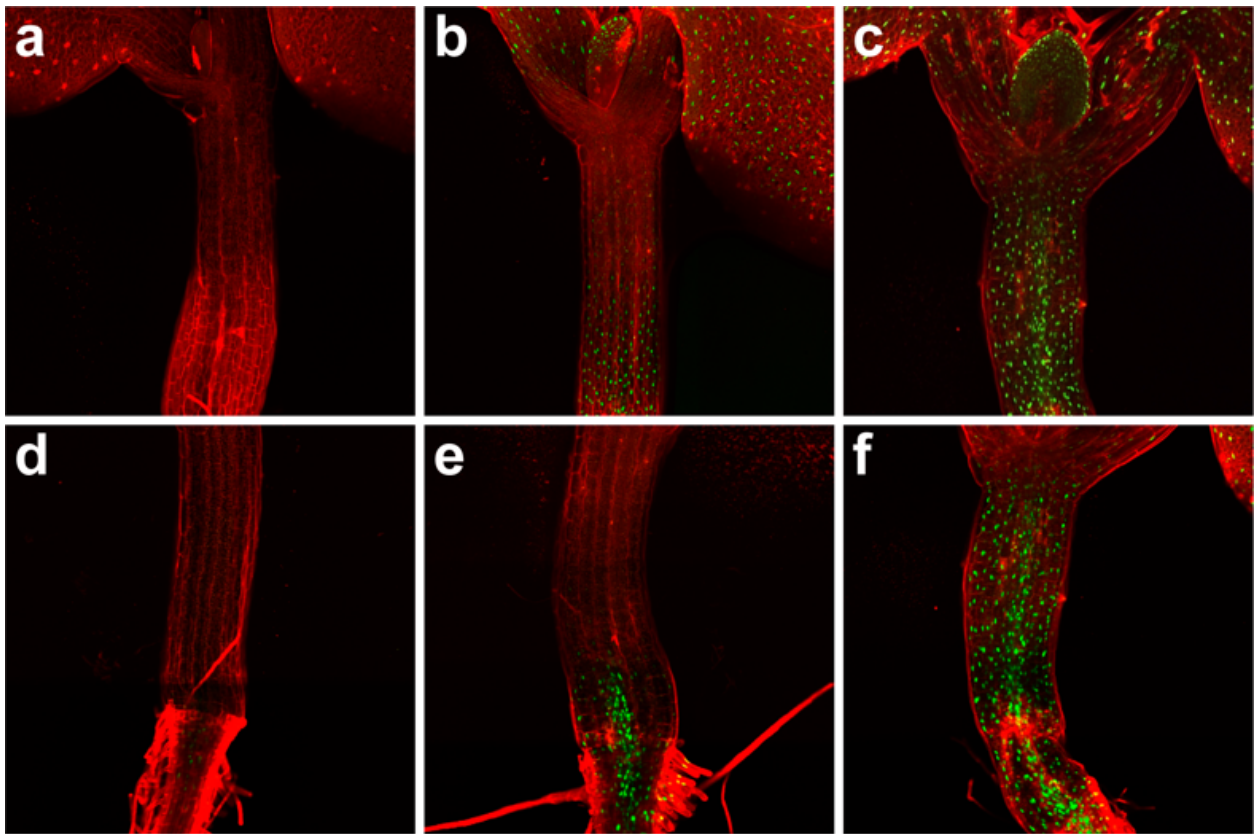
- Castulo-Rubio DY, Alejandre-Ramírez NA, Orozco-Mosqueda MC, Santoyo G, Macías-Rodríguez LI, Valencia-Cantero E (2015) Volatile organic compounds produced by the rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 modulate *Sorghum bicolor* (strategy II plant) morphogenesis and *SbFRO1* transcription in vitro. *J Plant Growth Regul* 34:611–623
- Chung HS, Koo AJK, Gao X, Jayanty S, Thines B, Jones AD, Howe GA (2008) Regulation and function of *Arabidopsis* JASMONATE ZIMDOMAIN genes in response to wounding and herbivory. *Plant Physiol* 146:952–964
- D’Agostino IB, Deruère J, Kieber JJ (2000) Characterization of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiol* 124:1706–1717
- Etesami H, Hosseini HM, Alikhani HA, Mohammadi L (2014) Bacterial biosynthesis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase and indole-3-acetic acid (IAA) as endophytic preferential selection traits by rice plant seedlings. *J Plant Growth Regul* 33:654–670

- Fonouni-Farde C, Diet A, Frugier F (2016) Root development and endosymbiosis: DELLAs lead the orchestra. *Trends Plant Sci* 21:898–900
- Henkes GJ, Thorpe MR, Minchin PEH, Schurr U, Röse UR (2008) Jasmonic acid treatment to part of the root system is consistent with simulated leaf herbivory, diverting recently assimilated carbon towards untreated roots within an hour. *Plant Cell Environ* 31:1229–1236
- Hernández-León R, Rojas-Solis D, Contreras-Pérez M, OrozcoMosqueda MC, Macías-Rodríguez LI, Reyes-de la Cruz H, Valencia-Cantero E, Santoyo G (2015) Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biol Control* 81:83–92
- Ishimaru Y, Oikawa T, Suzuki T, Takeishi S, Matsuura H, Takahashi K, Hamamoto S, Uozumi N, Shimizu T, Seo M, Ohta H, Ueda M (2017) GTR1 is a jasmonic acid and jasmonoyl-L-isoleucine transporter in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem* 81:249–255
- Jensen AB, Raventos D, Mundy J (2002) Fusion genetic analysis of jasmonate signalling mutants in *Arabidopsis*. *Plant J* 29:595–606
- Kim HJ, Chiang YH, Kieber JJ, Schaller GE (2013) SCF^{KMD} controls cytokinin signaling by regulating the degradation of type-B response regulators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:10028–10033
- Koo AJK, Gao X, Jones AD, Howe GA (2009) A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis*. *Plant J* 59:974–986
- Kudoyarova GR, Melentiev AI, Martynenko EV, Timergalina LN, Arkhipova TN, Shendel GV, Kuz'mina LY, Dodd IC, Veselov SY (2014) Cytokinin producing bacteria stimulate amino acid deposition by wheat roots. *Plant Physiol Biochem* 83:285–291
- Li Q, Zheng J, Li S, Huang G, Skilling SJ, Wang LL, Li M, Yuan L, Liu P (2017) Transporter-mediated nuclear entry of jasmonoyl-isoleucine is essential for jasmonate signaling. *Mol Plant* 10:695–708
- Liu W, Mu W, Zhu B, Liu F (2008) Antifungal activities and component of VOCs produced by *Bacillus subtilis* G8. *Current Res Bacteriol* 1:28–34
- Liu L, Li H, Zeng H, Cai Q, Zhou X, Yin C (2015) Exogenous jasmonic acid and cytokinin antagonistically regulate rice flag leaf senescence by mediating chlorophyll degradation, membrane deterioration, and senescence-associated genes expression. *J Plant Growth Regul* 35:366–376
- Moubayidin L, Di Mambro R, Sabatini S (2009) Cytokinin-auxin crosstalk. *Trends Plant Sci* 14:557–562
- Müller B, Sheen J (2008) Cytokinin and auxin interplay in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature* 453:1094–1097
- Naik GR, Mukherjee I, Reid DM (2002) Influence of cytokinins on the methyl jasmonate-promoted senescence in *Helianthus annuus* cotyledons. *Plant Growth Regul* 38:61–68
- Orozco-Mosqueda MC, Macías-Rodríguez LI, Santoyo G, Fariás-Rodríguez R, Valencia-Cantero E (2013) *Medicago truncatula* increases its iron uptake mechanism in response to volatile organic compounds produced by *Sinorhizobium meliloti*. *Folia Microbiol* 58:579–585
- Ortiz-Castro R, Martínez-Trujillo M, López-Bucio J (2008) N-acetyl-L-homoserine lactones: a class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* 31:1497–1509
- Ortiz-Castro R, Díaz-Pérez C, Martínez-Trujillo M, del Río-Torres RE, Campos-García J, López-Bucio J (2011) Transkingdom signaling based on bacterial cyclopeptides with auxin activity in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:7253–7258
- Raya-González J, Velázquez-Becerra C, Barrera-Ortiz S, López-Bucio J, Valencia-Cantero E (2017) N,N-dimethyl hexadecylamine and related amines regulate root morphogenesis via jasmonic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* 254:1399–1410
- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Wei HX, Paré PW, Kloepper JW (2003) Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4927–4932
- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Kloepper JW, Paré PW (2004) Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 134:1017–1026
- Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfett J, Guilfoyle T, Malamy J, Benfey P, Leyser O, Bechtold N, Weisbeek P, Scheres B (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in *Arabidopsis* root. *Cell* 99:463–472
- Sato C, Seto Y, Nabeta K, Matsuura H (2009) Kinetics of the accumulation of jasmonic acid and its derivatives in systemic leaves of tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc) and translocation of deuterium-labeled jasmonic acid from wounding site to the systemic site. *Biosci Biotechnol Biochem* 73:1962–1970
- Stoynova-Bakalova E, Petrov PI, Gigova L, Baskin TI (2007) Differential effects of methyl jasmonate on growth and division of etiolated zucchini cotyledons. *Plant Biol* 10:476–484
- Stratmann JW (2003) Long distance run in the wound response – jasmonic acid is pulling ahead. *Trends Plant Sci* 8:247–250
- Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He SY, Howe GA, Browse J (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{COI1} complex during jasmonate signalling. *Nature* 448:661–665
- Valencia-Cantero E, Flores-Cortez I, Ambriz-Parra J, López-Albarrán P, Velázquez-Becerra C (2015) *Arthrobacter agilis* UMCV2 accelerates growth of *Pinus devoniana*. *Phyton Int J Exp Bot* 84:64–69
- Velázquez-Becerra C, Macías-Rodríguez LI, López-Bucio J, Altamirano-Hernández J, Flores-Cortez I, Valencia-Cantero E (2011) A volatile organic compound analysis from *Arthrobacter agilis* identifies dimethylhexadecylamine, an amino-containing lipid modulating bacterial growth and *Medicago sativa* morphogenesis in vitro. *Plant Soil* 339:329–340
- Velázquez-Becerra C, Macías-Rodríguez LI, López-Bucio J, Flores-Cortez I, Santoyo G, Hernández-Soberano C, Valencia-Cantero E (2013) The rhizobacterium *Arthrobacter agilis* produces dimethylhexadecylamine, a compound that inhibits growth of phytopathogenic fungi in vitro. *Protoplasma* 250:1251–1262
- Zhang ZP, Baldwin IT (1997) Transport of [2-¹⁴C]jasmonic acid from leaves to roots mimics wound-induced changes in endogenous jasmonic acid pools in *mi Nicotiana glauca*. *Planta* 203:436–441
- Zhang Y, Turner JG (2008) Wound-induced endogenous jasmonates stunt plant growth by inhibiting of mitosis. *PLoS One* 3:e3699.



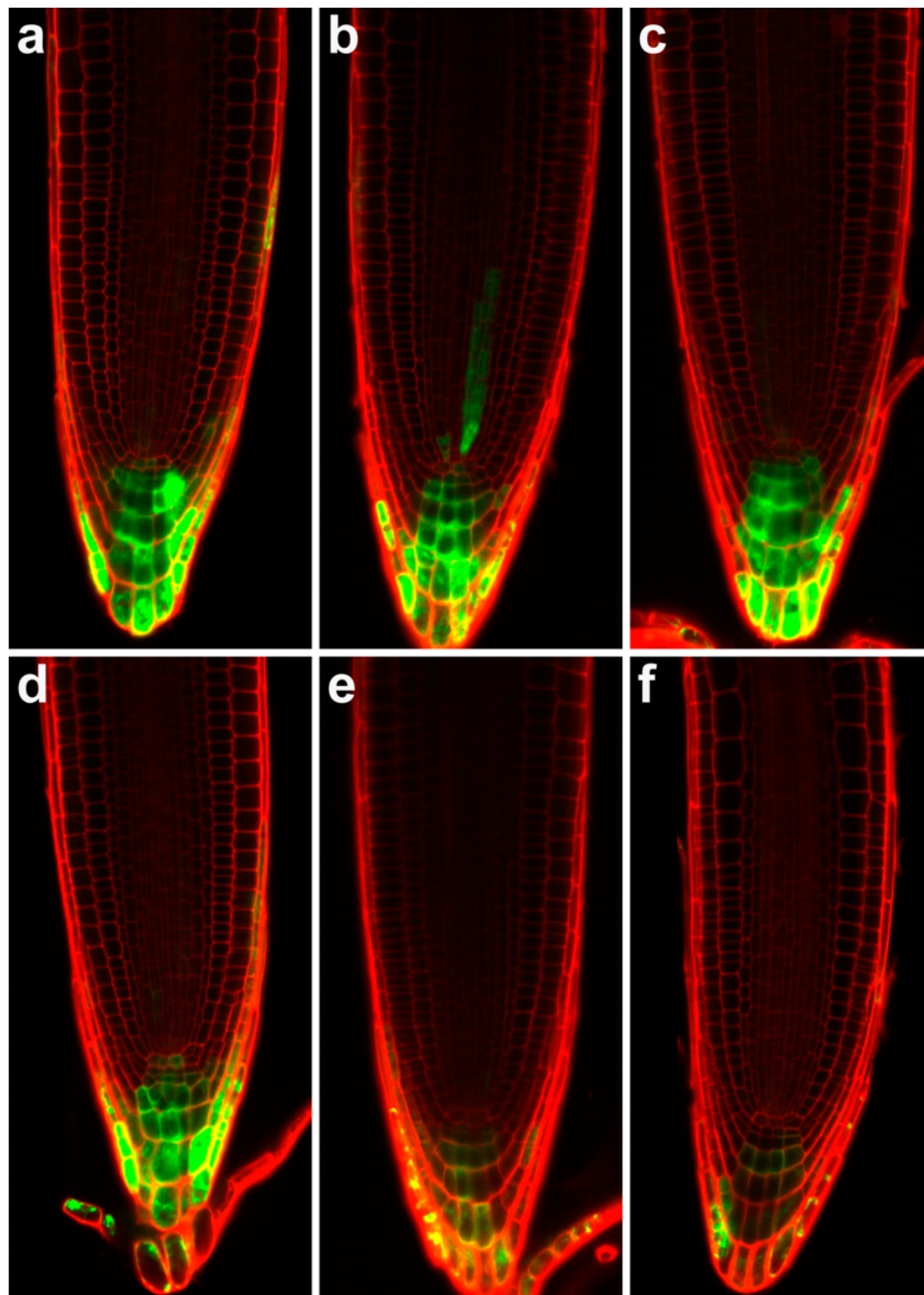
Supplementary figure 1.

JA upregulates expression of *JAZ1* in nuclei of epidermal cells in cotyledons. Representative confocal images of epidermal cells of cotyledons 12 h after contact with 0.2X MS medium drops without JA (a) or supplemented with 128 μ M JA (b).



Supplementary figure 2.

Expression of early JA-response *JAZ1* gene shows JA signaling translocation from shoot to stem. Representative confocal images of epidermal cells of stems 24 h after contact with 0.2X MS medium drops without JA (a and d) or supplemented with 64 μ M (b and e) or 128 μ M (c and f).



Supplementary figure 3.

TCS::GFP expression is systemically downregulated by cotyledon wounding. Cotyledons of 4 day seedlings were wounded and the root apex was photographed with a confocal microscope. Representative images are shown from at least 15 seedlings analyzed. The experiment was repeated twice with similar results.

7. Discusión.

Las rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR) han coevolucionado con las plantas, de tal manera que han creado relaciones íntimas durante el paso del tiempo, tal es el caso de los nódulos formados por la simbiosis entre las bacterias rizobiales fijadoras de nitrógeno y las fabaceae, específicamente las pertenecientes a las sub-familias Caesalpinioideae y Papilionoideae (Andrews *et al.*, 2018). De varias maneras, las PGPR ayudan a las plantas a sobrellevar y a adaptarse a condiciones desfavorables, i.e. pueden activar la resistencia sistémica inducida (ISR), para enfrentar ataques de organismos necrótrofos (e.g. *Fusarium sp.* o) y hemibiótrofos (e.g. *Pseudomonas syringae* o *Colletotrichum orbiculare*) (Ryu *et al.*, 2004). Se ha demostrado que la activación de la ISR depende de la estimulación de la vía de señalización del ácido jasmónico (AJ) e interesantemente algunas PGPR como *Bacillus subtilis* GB03 lo hacen por un mecanismo menos estudiado, mediante la liberación de compuestos volátiles orgánicos (VOC), lo que resulta en una disminución de hojas sintomáticas por el ataque del patógeno necrótrofo *Pectobacterium carotovora* (antes *Erwinia carotovora*) (Ryu *et al.*, 2004).

En nuestro grupo de investigación se estudia la PGPR *Arthrobacter agilis* UMCV2 que produce el VOC dimetil hexadecilamina (DMHDA), un aminolípido capaz de inhibir el crecimiento del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* y del oomicete *Phytophthora cinnamomi* (Velázquez-Becerra *et al.*, 2011; Velázquez-Becerra *et al.*, 2013). En *Arabidopsis thaliana*, la DMHDA actúa activando la vía de señalización del AJ e inhibe el crecimiento de la raíz primaria, como se ha visto que lo hace el AJ (Staswick *et al.*, 1992; Raya-González *et al.*, 2017). Sobresalientemente, la DMHDA tiene un efecto inhibitorio conservado sobre el crecimiento de la raíz primaria de diferentes especies como *Medicago sativa*, *Sorghum bicolor* y *Pinus devoniana* (Velázquez-Becerra *et al.*, 2011; Castulo-Rubio *et al.*, 2015; Valencia-Cantero *et al.*, 2015). Estudios en *Arabidopsis thaliana*, han dilucidado que el crecimiento de la raíz es controlado principalmente por una interacción antagónica entre los reguladores maestros del crecimiento auxinas y citocininas, formándose un gradiente de concentraciones. En la zona meristemática se encuentra una relación de concentraciones del ácido indol acético (AIA) alta – citocininas (CK) baja, la cual gradualmente se invierte en la zona de transición/elongación a AIA baja – CK alta. Las auxinas promueven la división

celular en la zona meristemática, mientras que las CK diferencian las células provenientes del meristemo estableciendo la zona de transición/elongación (Moubayidin *et al.*, 2009; Heidstra y Sabatini, 2014; Fonouni-Farde *et al.*, 2016).

Debido a que la característica más prominente de las CK es la capacidad de promover el crecimiento (Schaller *et al.*, 2014), mientras que el AJ se destaca por su efecto inhibitor del crecimiento (Staswick *et al.*, 1992), se convierte de nuestro interés particular, la interacción entre el AJ y las CK durante el crecimiento de la raíz en relación a la respuesta a la DMHDA. Casos de interacción antagónica entre AJ y CK en diversos aspectos del desarrollo de las plantas han sido documentados, por ejemplo, en los cotiledones de calabaza la división celular promovida por CK es revertida por el AJ, o la senescencia de las hojas de arroz inducida por el AJ es contrarrestada por la suplementación de CK, entre otros casos (Stoyanova-Bakalova *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2015).

Experimentos que se realizaron en el presente trabajo utilizando a la línea reportera *JAZ1::JAZ1:GFP* como marcador de respuesta a AJ, junto con los resultados de Raya-González *et al.* (2017), demuestran que la DMHDA actúa a través de la activación de la vía de señalización del AJ, y como se ha reportado, a su vez el AJ puede inhibir el crecimiento de la raíz primaria (Staswick *et al.*, 1992). Destacadamente, se demostró que el efecto inhibitor sobre el crecimiento de la raíz primaria de *A. thaliana* que tiene la DMHDA y el AJ es contrarrestado por la adición de zeatina, una CK. Para corroborar tal antagonismo entre la DMHDA y el AJ con las CK, usamos las líneas reporteras *ARR5:GUS* y *TCS::GFP* marcadoras de respuesta a CK. Observamos que tanto la DMHDA como el AJ reprimen la expresión de ambos marcadores de CK, demostrando que hay una interacción negativa entre la DMHDA y el AJ con las CK durante la inhibición del crecimiento.

Por otra parte, estudiamos el funcionamiento del AJ como molécula señal sistémica, ya que se ha propuesto que la sistemina es la responsable de transportar la señal a las partes no dañadas de la planta después del ataque del patógeno o herida mecánica (Ryan, 2000). Para esto, utilizamos gotas de medio MS (0.2X) con altas concentraciones de AJ, 64 y 128 μ M, sobre las que los cotiledones de plántulas de *A. thaliana* de la línea reportera *JAZ1::JAZ1:GFP* se recargaron, la demás parte se posó en medio MS 0.2X sin AJ. La activación en la expresión del marcador de AJ en los cotiledones empezó desde las 3 horas después del tratamiento y gradualmente fue

aumentando hasta tener un máximo de expresión a las 24 h, 48 h después la señal disminuyó para ambas concentraciones de AJ, aunque sin llegar a la expresión control. Observamos que la señal del AJ viajó a el hipocótilo, pasando por la coronilla (zona de unión entre hipocótilo y raíz) y hacia la raíz, lugares donde se activó la expresión del marcador de AJ, el mismo patrón de expresión se obtuvo desde las 3 h, donde hubo un máximo de expresión a las 24 h y decaimiento a las 48 h que tampoco llegó a la expresión basal.

En la parte media de la raíz la señal tardó en llegar, activándose la expresión del marcador de AJ hasta 6 h y 12 h después del tratamiento a la concentración de 128 μ M y 64 μ M de AJ, respectivamente, la expresión máxima fue a las 24 h y la señal decayó a las 48 h después del tratamiento sin llegar a la expresión control para ambas concentraciones. Sin embargo, la expresión de *JAZ1::JAZ1:GFP* no se observó en el meristemo de la raíz primaria. Un segundo marcador de la señal de AJ, *JAZ10::JAZ10:GFP*, fue activado en el meristemo apical a las 6 h y a las 12 h después del tratamiento en los cotiledones a las concentraciones de 128 μ M y 64 μ M de AJ, respectivamente. Interesantemente, la expresión de *JAZ10::JAZ10:GFP* continuó hasta las 48 h sin disminuir en la concentración de 64 μ M de AJ y hubo una leve disminución pero igual se mantuvo constante la señal a la concentración de 128 μ M de AJ. Comparablemente la DMHDA activa la expresión del *JAZ1::JAZ1:GFP* marcador de AJ.

Ya que teníamos demostrado que la señal del AJ desde los cotiledones viajó hasta el meristemo de la raíz primaria, utilizamos la misma metodología de las gotas de medio con AJ pero ahora usando el marcador de CK *TCS::GFP* para demostrar que mientras la vía de señalización de AJ se activaba la señal de CK se reprime de manera sistémica. Como esperábamos, la expresión del marcador de CK se reprimió, en cuanto la expresión de los marcadores de AJ aumentó sistémicamente, esto se correlacionó con una inhibición sistémica del crecimiento de la raíz primaria.

Bien sabido es que en respuesta a las heridas mecánicas el AJ es biosintetizado (Wasternack y Strnad, 2018). El uso de las gotas de medio con AJ simula a las heridas mecánicas, para corroborarlo, usamos las líneas reporteras de biosíntesis *LOX2::uidA* y respuesta *JAZ1::JAZ1:uidA* a AJ, herimos los cotiledones con una aguja y observamos que ambos genes reporteros se activaban. Aún más, en la línea *LOX2::uidA* solo herimos un cotiledón, y la expresión del marcador 12 h después se

activó en el cotiledón sistémico no herido. También las heridas en los cotiledones inhibieron el crecimiento de la raíz primaria, lo cual se correlacionó con una represión en la expresión del marcador a CK *TCS::GFP*. Con esto aclaramos que el AJ puede funcionar como molécula señal que viaja desde su lugar de biosíntesis, donde ocurre el daño, hasta las partes sistémicas de la planta para regular negativamente el crecimiento, e.g. en la raíz primaria antagonizando la señal de CK. Otros trabajos también indican que el AJ es la molécula señal que actúa después de una herida (Li *et al.*, 2002).

8. Conclusión.

La DMHDA es un compuesto volátil producido por las PGPR con efecto en organismo de diferentes reinos, desde las mismas bacterias hasta plantas, hongos, oomicetes y muy probablemente en animales también. *In planta*, la DMHDA tiene su efecto represor del crecimiento de la raíz primaria a través de la estimulación de la vía de señalización del AJ y este a su vez antagoniza a las CK. Adicionalmente el AJ (como la hace la sistemina) puede funcionar como molécula señal sistémica en respuesta a estrés biótico y abiótico.

9. Bibliografía

Ahemad M, Kibret M (2014) Mechanism and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King Saud University-Science* **26**:1-20.

Alizadeh M (2017) First report of *Arthrobacter agilis* associated with elm trees in Iran. *Journal of Plant Chemistry and Ecophysiology* **2**:1013.

Andersen EJ, Ali S, Byamukama E, Yen Y, Nepal MP (2018) Disease resistance mechanism in plants. *Genes (Basel)* **9**:339.

Andrews M, De Meyer S, James EK, Stepkowski T, Hodge S, Simon MF, Young PW (2018) Horizontal transfer of symbiosis genes within and between rhizobial genera: occurrence and importance. *Genes* **9**:321.

Aviles-Garcia ME, Flores-Cortez I, Hernández-Soberano C, Santoyo G, Valencia-Cantero E (2016) La rizobacteria promotora del crecimiento vegetal *Arthrobacter agilis* UMCV2 coloniza endofíticamente a *Medicago truncatula*. *Revista Argentina de Microbiología* **48**:342-346.

Biere A, Tack AJM (2013) Evolutionary adaptation in three-way interactions between plants, microbes and arthropods. *Functional Ecology* **27**:646-660.

Blüher D, Laha D, Thieme S, Hofer A, Eschen-Lippold L, Masch A, Balcke G, Pavlovic I, Nagel O, Schonsky A, Hinkelmann R, Wörner J, Parvin N, Greiner R, Weber S, Tissier A, Schutkowski M, Lee J, Jessen H, Schaaf G, Bonas U (2017) A 1-phytase type III effector interferes with plant hormone signaling. *Nature Communications* **8**:2159.

Brotman Y, Landau U, Cuadros-Inostroza A, Takayuki T, Fernie AR, Chet I, Viterbo A, Willmitzer L (2013) *Trichoderma*-plant root colonization: escaping early plant defense response and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. *PLoS Pathogens* **9**:e1003221.

Buades Fuster JM, Sanchis Cortés P, Perelló Bestard J, Grases Freixedas F (2017) Plant phosphates, phytate and pathological calcifications in chronic kidney disease. *Nefrologia* **37**:20-28.

Burian A, Barbier de Reuille P, Kuhlemeier C (2016) Patterns of stem cell divisions contribute to plant longevity. *Current Biology* **26**:1385-1394.

Caarls L, Elberse J, Awwanah M, Ludwig NR, de Vries M, Zeilmaker T, Van Wees SCM, Schuurink RC, Van den Ackerveken G (2017) *Arabidopsis* JASMONATE-INDUCED OXYGENASES down-regulate plant immunity by hydroxylation and activation of the hormone jasmonic acid. *Proceedings of The National Academy of Science USA* **114**:6388-6393.

Castulo-Rubio DY, Alejandre-Ramírez NA, Orozco-Mosqueda MC, Santoyo G, Macías-Rodríguez LI, Valencia-Cantero E (2015) Volatile organic compounds produced by the rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 modulate *Sorghum bicolor* (strategy II plant) morphogenesis and *SbFRO1* transcription in vitro. *Journal of Plant Growth Regulation* **34**:611-623.

Chini A, Monte I, Zamarreño AM, Hamberg M, Lassueur S, Reymond P, Weiss S, Stintzi A, Schaller A, Porzel A, García-Mina JM, Solano R (2018) An OPR3-independent pathway uses 4,5-didehydrojasmonate for jasmonate synthesis. *Nature Chemical Biology* **14**:171-178.

Cortleven A, Leuendorf JA, Frank M, Pezzetta D, Bolt S, Schmülling T (2019) Cytokinin action in response to abiotic and biotic stress in plants. *Plant, Cell & Environment* **42**:998-1018.

Crovadore J, Grizard D, Chablais R, Cochard B, Blanc P, Lefort F (2018) Whole-genome sequences of two *Arthrobacter* sp. strains, 4041 and 4042, potentially usable in agriculture and environmental depollution. *Microbiology Resource Announcements* **7**:e01054-18.

de Vries J, Archibald JM (2018) Plant evolution: landmarks on the path to terrestrial life. *New Phytologist* **217**:1428-1434.

Dieser M, Greenwood M, Foreman CM (2010) Carotenoid pigmentation in antarctic heterotrophic bacteria as a strategy to withstand environmental stresses. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* **42**:396-405.

Dóczi R, Brader G, Pettkó-Szandtner A, Rajh I, Djamei A, Pitzschke A, Teige M, Hirt H (2007) The *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase MKK3 is upstream of group C mitogen-activated protein kinase and participates in pathogen signaling. *Plant Cell* **19**:3266-3279.

El-Showk S, Ruonala R, Helariutta Y (2013) Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. *Development* **140**:1373-1383.

Eppard M, Krumbein WE, Koch C, Rhiel E, Staley JT, Stackebrandt E (1996) Morphological, physiological, and molecular characterization of actinomycetes isolated from dry soil, rocks, and monument surface. *Archives of Microbiology* **166**:12-22.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2009. La FAO en México, más de 60 años de cooperación 1945-2009. México: Representación de la FAO en México, 368 pp.

FAO, FIDA, UNICEF, PMA y OMS. 2018. El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo. Fomentando la resiliencia climática en aras de la seguridad alimentaria y la nutrición. FAO, Roma.

Farmer EE, Ryan CA (1990) Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **87**:7713-7716.

Fong NJC, Burgess ML, Barrow KD, Glenn DR (2001) Carotenoid accumulation in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter agilis* in response to thermal and salt stress. *Applied Microbiology and Biotechnology* **56**:750-756.

Fonouni-Farde C, Diet A, Frugier F (2016) Root development and endosymbiosis: DELLAs lead the orchestra. *Trends in Plant Science* **21**:898-900.

Gimenez-Ibanez S, Boter M, Fernández-Barbero G, Chini A, Rathjen JP, Solano R (2014) The bacterial effector HopX1 targets JAZ transcriptional repressors to activate jasmonate signaling and promote infection in *Arabidopsis*. *PLoS Biology* **12**:e1001792.

Giraldo MC, Dagdas YF, Gupta YK, Mentlak TA, Yi M, Martinez-Rocha AL, Saitoh H, Terauchi R, Talbot NJ, Valent B (2013) Two distinct secretion systems facilitate tissue invasion by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Nature Communications* **4**:1996.

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

Gouda S, Kerry RG, Das G, Paramithiotis S, Shin HS, Patra JK (2018) Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research* **206**:131-140.

Han GZ (2019) Origin and evolution of the immune system. *New Phytologist* **222**:70-83.

Hwang I, Sheen J, Müller B (2012) Cytokinin signaling networks. *Annual Reviews of Plant Biology* **63**:353-380.

Heidstra R, Sabatini S (2014) Plant and animal stem cells: similar yet different. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15**:301-312.

Heidstra R, Sabatini S (2014) Plant and animal stem cells: similar yet different. *Nature Review Molecular Cell Biology* **15**:301-312.

Hernández-León R, Rojas-Solís D, Contreras-Pérez M, Orozco-Mosqueda MC, Macías-Rodríguez LI, Reyes-de la Cruz H, Valencia-Cantero E, Santoyo G (2015) Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and

volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Bio Control* **81**:83-92.

Hou S, Liu Z, Shen H, Wu D (2019) Damage-associated molecular pattern-triggered immunity in plants. *Frontiers in Plant Science* **10**:646.

Huang H, Liu B, Liu L, Song S (2017) Jasmonate action in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany* **68**:1349-1359.

Jiang S, Yao J, Ma KW, Zhou H, Song J, He SY, Ma W (2013) Bacterial effector activates jasmonate signaling by directly targeting JAZ transcriptional repressors. *PLoS Pathogens* **9**:e1003715.

Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* **444**:323-329.

Jones JDG, Vance RE, Dangl JL (2016) Intracellular innate immune surveillance device in plants and animals. *Science* **354**:aaf6395.

Kanekar PP, Sarnalk SS, Kelkar AS (1998) Bioremediation of phenol by alkaliphilic bacteria isolated from lake of Lonar, India. *Journal of Applied Microbiology* **85**:128S-133S.

Karasov TL, Horton MW, Bergelson J (2014) Genomic variability as a driver of plant-pathogen coevolution?. *Current Opinion in Plant Biology* **18**:24-30.

Katagiri F, Tsuda K (2010) Understanding the plant immune system. *Molecular Plant Microbe Interaction* **23**:1531-1536.

Kazan K, Manners JM (2008) Jasmonate signaling: toward an integrated view. *Plant Physiology* **146**:1459-1468.

Kieber JJ, Schaller GE (2014) Cytokinins. *Arabidopsis Book* **12**:e0168.

Kieber JJ, Schaller GE (2018) Cytokinin signaling in plant development. *Development* **145**:dev149344.

Kienow L, Schneider K, Bartsch M, Stuible HP, Weng H, Miersch O, Wasternack C, Kombrink E (2008) Jasmonates meet fatty acids: functional analysis of new acyl-coenzyme A synthetase family from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **59**:403-419.

Koch C, Schumann P, Stackebrandt E (1995) Reclassification of *Micrococcus agilis* (Ali-Cohen 1889) to the genus *Arthrobacter* as *Arthrobacter agilis* comb. nov. and emendation of the genus *Arthrobacter*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**: 837-839.

Krysan P, Colcombet J (2018) Cellular complexity in MAPK signaling in plants: questions and emerging tools to answer them. *Frontiers in Plant Science* **9**:1674.

Laha D, Johnen P, Azevedo C, Dynowski M, Weiß M, Capolicchio S, Mao H, Iven T, Steenbergen M, Freyer M, Gaugler P, de Campos MKF, Zheng N, Feussner I, Jessen HJ, Van Wees SCM, Saiardi A, Schaaf G (2015) VIH2 regulates the synthesis of inositol pyrophosphate InsP₈ and jasmonate-dependent defense in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **27**:1082-1097.

Lai Y, Eulgem T (2018) Transcript-level expression control of plant NLR genes. *Molecular Plant Pathology* **19**:1267-1281.

Lal NK, Nagalakshmi U, Hurlburt NK, Flores R, Bak A, Sone P, Ma X, Song G, Walley J, Shan L, He P, Casteel C, Fisher AJ, Dinesh-Kumar SP (2018) The receptor-like cytoplasmic kinase NIK1 localizes to the nucleus and regulates defense hormone expression during plant innate immunity. *Cell Host and Microbe* **23**:485-497.

Laluk K, Mengiste T (2010) Necrotroph attacks on Plants: wanton destruction or covert extortion?. *The Arabidopsis Book* **8**:e0136.

Leiva S, Alvarado P, Huang Y, Wang J, Garrido I (2015) Diversity of pigmented gram-positive bacteria associated with marine macroalgae from antarctica. *FEMS Microbiology Letters* **362**:fnv206.

Li L, Li C, Lee GI, Howe GA (2002) Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **99**:64-6421.

Li Q, Zheng J, Li S, Huang G, Skilling SJ, Wang L, Li L, Li M, Yuan L, Liu P (2017) Transporter-mediated nuclear entry of jasmonoyl-isooleucine is essential for jasmonate signaling. *Molecular Plant* **10**:695-708.

Li R, Zhang J, Li J, Zhou G, Wang Q, Bian W, Erb M, Lou Y (2015) Prioritizing plant defence over growth through WRKY regulation facilitates infestation by non-target herbivores. *eLife* **4**:e04805.

Liu L, Li H, Zeng H, Cai Q, Zhou X, Yin C (2015) Exogenous jasmonic acid and cytokinin antagonistically regulate rice flag leaf senescence by mediating chlorophyll degradation, membrane deterioration, and senescence-associated genes expression. *Journal of Plant Growth Regulation* **35**:366-376.

Liu W, Wei M, Bingyu Z, Feng L (2008) Antifungal activities and components of VOCs produced by *Bacillus subtilis* G8. *Current Research in Bacteriology* **1**:28-34.

McDowell JM, Woffenden BJ (2003) Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends in Biotechnology* **21**:178-183.

Mengiste T (2012) Plant immunity to necrotrophs. *Annual Review of Phytopathology* **50**:13.1-13.28.

Meyers BC, Kozik A, Griego A, Kuang H, Michelmore RW (2003) Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. *The Plant Cell* **15**:809-834.

Mosblech A, Thurow C, Gatz C, Feussner I, Heilmann I (2011) jasmonic acid perception by COI1 involves inositol polyphosphates in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **65**:949-957.

Moubayidin L, Di Mambro R, Sabatini S (2009) Cytokinin-auxin crosstalk. *Trends in Plant Science* **14**:557-562.

Munné-Bosch S (2018) Limits to tree growth and longevity. *Trends in Plant Science* **23**:985-993.

Occhipinti A (2013) Plant coevolution: evidence and new challenges. *Journal of Plant Interactions* **8**:188-196.

Orozco-Mosqueda M del C, Macías-Rodríguez LI, Santoyo G, Farías-Rodríguez R, Valencia-Cantero E (2013) *Medicago truncatula* increase its iron-uptake mechanisms in response to volatile organic compounds produced by *Sinorhizobium meliloti*. *Folia Microbiologica* **58**:579-585.

Orozco-Mosqueda M del C, Valencia-Cantero E, López-Albarrán P, Martínez-Pacheco M, Velázquez-Becerra C (2015) La bacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 y diversas aminos inhiben el crecimiento in vitro de hongos destructores de madera. *Revista Argentina de Microbiología* **47**:219-228.

Orozco-Mosqueda M del C, Velázquez-Becerra C, Macías-Rodríguez L I, Santoyo G, Flores-Cortez I, Alfaro-Cuevas R, Valencia-Cantero E (2013) *Arthrobacter agilis* UMCV2 induces iron adquisition in *Medicago truncatula* (strategy I plant) in vitro via dimethylhexadecylamine emission. *Plant Soil* **362**:51-66.

Orum TV, Ferguson N, Mihail JD (2016) Saguaro (*Carnegiea gigantea*) mortality and population regeneration in the cactus forest of Saguaro National Park: seventy-five years and counting. *PLoS ONE* **11**: e0160899.

Ozdal M, Ozdal OG, Sezen A, Algur OF, Kurbanoglu EB (2017) Continuous production of indol-3acetic acid by immobilized cells of *Arthrobacter agilis*. *3 Biotech* **7**:23.

Pekárová B, Szmitkowska A, Dopitová R, Degtjarik O, Zídek L, Hejátko J (2016) Structural aspects of multiple phosphorelay-mediated signaling in plants. *Molecular Plant* **9**:71-85.

Phukan UJ, Jeena GS, Shukla RK (2016) WRKY transcription factors: molecular regulation and stress response in plants. *Frontiers in Plant Science* **7**:760.

Plett JM, Daguerre Y, Wittulsky S, Vayssières A, Deveau A, Melton SJ, Kohler A, Morrell-Falvey JL, Brun A, Veneault-Fourrey C, Martin F (2014) Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus *Laccaria bicolor* stabilizes the *Populus* JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. *Proceedings of The National Academy of Science* **111**:8299-8304.

Rao S, Zhou Z, Miao P, Bi G, Hu M, Wu Y, Feng F, Zhang X, Zhou JM (2018) Roles of receptor-like cytoplasmic kinase VII members in pattern-triggered immune signaling. *Plant Physiology* **177**:1679-1690.

Raya-González J, Velázquez-Becerra C, Barrera-Ortiz S, López-Bucio J, Valencia-Cantero E (2017) *N,N*-dimethyl hexadecylamine and related amines regulate root morphogenesis via jasmonic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* **254**:1399-1410.

Reitsma JM, Liu X, Reichermeier KM, Moradian A, Sweredoski MJ, Hess S, Deshaies RJ (2017) Composition and regulation of the cellular repertoire of SCF ubiquitin ligases. *Cell* **171**:1326-1339.

Revillini D, Gehring CA, Johnson NC (2016) The role of locally adapted mycorrhizas and rhizobacteria in plant-soil feedback systems. *Functional Ecology* **30**:1086-1098.

Riemann M, Dhakarey R, Hazman M, Miro B, Kohli A, Nick P (2015) Exploring jasmonates in the hormonal network of drought and salinity responses. *Frontiers in Plant Science* **6**:1077.

Rodriguez-Alonso G, Matvienko M, López-Valle ML, Lázaro-Mixteco PE, Napsucialy-Mendivil S, Dubrovsky JG, Shishkova S (2018) Transcriptomics insights into the genetic regulation of root apical meristem exhaustion and determinate primary root growth in *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *Scientific Reports* **8**:8529.

Rojas JL, Martín J, Tormo JR, Vicente F, Brunati M, Ciciliato I, Losi D, Van Trappen S, Mergaert J, Swings J, Marinelli F, Genilloud O (2009) Bacterial diversity from benthic mats of Antarctic lakes as a source of new bioactive metabolites. *Marine Genomics* **2**:33-41.

Ruan J, Zhou Y, Zhou M, Yan J, Khurshid M, Weng W, Cheng J, Zhang K (2019) Jasmonic acid signaling pathway in plants. *International Journal of Molecular Science* **20**:2479.

Ryan CA (2000) The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1477**:112-121.

Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Kloepper JW, Paré PW (2004) Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **134**:1017-1026.

Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Wei HX, Paré PW, Kloepper JW (2003) Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of The National Academy of Science USA* **100**:4927-4932.

Schaller A, Stintzi A (2009) Enzymes in jasmonate biosynthesis – Structure, function, regulation. *Phytochemistry* **70**:1532-1538.

Schaller GE, Street IH, Kieber JJ (2014) Cytokinin and the cell cycle. *Current Opinion in Plant Biology* **21**:7-15.

Schweizer F, Bodenhausen N, Lassueur S, Masclaux FG, Reymond P (2013) Differential contribution of transcription factors to *Arabidopsis thaliana* defense against *Spodoptera littoralis*. *Frontiers in Plant Science* **4**:13.

Shamrai SN (2014) Plant immune system: Basal immunity. *Cytology and Genetics* **48**: 258-271.

Sheard LB, Tan X, Mao H, Withers J, Ben-Nissan G, Hinds TR, Kobayashi Y, Hsu FF, Sharon M, Browse J, He SY, Rizo J, Howe GA, Zheng N (2010) Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature* **468**:400-405.

Shim JS, Jung C, Lee S, Min K, Lee YW, Choi Y, Lee JS, Song JT, Kim JK, Choi YD (2013) AtMYB44 regulates WRKY70 expression and modulates antagonistic interaction between salicylic acid and jasmonic acid signaling. *The Plant Journal* **73**:483-495.

Shishkova S, Rost TL, Dubrovsky JG (2008) Determinate root growth and meristem maintenance in angiosperms. *Annals of Botany* **101**:319-340.

Singh RN, Gaba S, Yadav AN, Gaur P, Gulati S, Kaushik R, Saxena AK (2016) First high quality draft genome sequence of plant growth promoting and cold active enzyme producing psychrotrophic *Arthrobacter agilis* strain L77. *Standards in Genomic Science* **11**:54.

Smirnova E, Marquis V, Poirier L, Aubert Y, Zumsteg J, Ménard R, Miesch L, Heitz T (2017) Jasmonic acid oxidase 2 hydroxylates jasmonic acid and represses basal defense and resistance response against *Botrytis cinerea* infection. *Molecular Plant* **10**:1159-1173.

Solyanikova IP, Emelyanova EV, Shumkova ES, Egorova DO, Korsakova ES, Plotnikova EG, Golovleva LA (2015) Peculiarities of the degradation of benzoate and its chloro- and hydroxy-susbtitued analogs by antinobacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation* **100**:155-164.

Solyanikova IP, Suzina NE, Egozarian NS, Polivtseva VN, Prisyazhnaya NV, El-Registran GI, Mulyukin AL, Golovleva LA (2017) The response of soil *Arthrobacter agilis* lush13 to changing conditions: Transition between vegetative and dormant state. *Journal of Environmental Science and Health part B* **52**:745-751.

Staswick P. E., Su W., Howell S. H. 1992. Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **89**: 6837-6840.

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

Stoynova-Bakalova E., Petrov P. I., Gigova L., Baskin T. I. 2007. Differential Effects of methyl jasmonate on growth and division of etiolated zucchini cotyledons. *Plant Biology* **10**: 476-484.

Sun T, Nitta Y, Zhang Q, Wu D, Tian H, Lee JS, Zhang Y (2018) Antagonistic interactions between two MAP kinase cascade in plant development and immune signaling. *EMBO Reports* **19**:e45324.

Takahashi F, Yoshida R, Ichimura K, Mizoguchi T, Seo S, Yonezawa M, Maruyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2007) The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3-MPK6 is an important part of the jasmonate signaling transduction pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**:805-818.

Tescari M, Frangipani E, Caneva G, Municchia AC, Sodo A, Visca P (2018) *Arthrobacter agilis* and Rosy discoloration in “Terme del Foro” (Pompeii, Italy). *International Biodeterioration & Biodegradation* **130**:48-54.

Thaler JS, Owen B, Higgins VJ (2004) The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. *Plant Physiology* **135**:530-538.

Timmusk S, Grantcharova N, Wagner EGH (2005) *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:7292-7300.

Timmusk S., Nevo E. (2011) Plant root associated biofilms: Perspectives for natural product mining. En: Maheshwari DK, editor. *Bacteria in agrobiology: Plant nutrient management*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 285-300.

Tonn N, Greb T (2017) Radial Plant Growth. *Current Biology* **27**: R878-R882.

Toruño TY, Stergiopoulos I, Coaker G (2016) Plant-pathogen effectors: cellular probes interfering with plants defenses in spatial and temporal manners. *Annual Review of Phytopathology* **54**:419-441.

Tsuda K, Somssich IE (2014) Transcriptional networks in plant immunity. *New Phytologist* **206**:932-947.

Turner JG, Ellis C, Devoto A (2002) The jasmonate signal pathway. *The Plant Cell* **14**:s153-s164.

Ueda J, Kato J (1980) Isolation and identification of a senescence-promoting substance from wormwood (*Artemisia Absinthium* L.). *Plant Physiology* **66**:246-249.

Uhse S, Djamel A (2018) Effectors plant-colonizing fungi and beyond. *PLoS Pathogens* **14**:e1006992.

Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud ML, Touraine B, Loccoz YM, Muller D, Legendre L, Dye FW, Combaret CP (2013) Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science* **4**:356.

Valencia-Cantero E, Flores-Cortez I, Ambriz-Parra J, López-Albarrán P, Velázquez-Becerra C (2015) *Arthrobacter agilis* UMCV2 accelerates growth of *Pinus devoniana*. *Phyton International Journal of Experimental Botany* **84**:64-69.

Valencia-Cantero E, Hernández-Calderón E, Velázquez-Becerra C, López-Meza JE, Alfaro-Cuevas R, López-Bucio J (2007) Role of dissimilatory fermentative iron-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. *Plant Soil* **291**:263-273.

Van der Biezen EA, Jones JDG (1998) Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Biochemical Science* **23**:454-456.

Varden FA, De la Concepcion JC, Maidment JHR, Banfield MJ (2017) Taking the stage: effectors in the spotlight. *Current Opinion in Plant Biology* **38**:25-33.

Velázquez-Becerra C, Macías-Rodríguez LI, López-Bucio J, Altamirano-Hernández J, Flores-Cortez I, Valencia-Cantero E (2011) A volatile organic compound analysis from *Arthrobacter agilis* identifies dimethylhexadecylamine, an amino-containing lipid modulating bacterial growth and *Medicago sativa* morphogenesis in vitro. *Plant Soil* **339**:329-340.

Velázquez-Becerra C, Macías-Rodríguez LI, López-Bucio J, Flores-Cortez I, Santoyo G, Hernández-Soberano C, Valencia-Cantero E (2013) The rhizobacterium *Arthrobacter agilis* produces dimethylhexadecylamine, a compound that inhibits growth of phytopathogenic fungi in vitro. *Protoplasma* **250**:1251-1262.

Wasternack C, Hause B (2013) Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals Botany*. *Annals of Botany* **111**:1021-1058.

Wasternack C, Strnad M (2018) Jasmonates: news on occurrence, biosynthesis, metabolism and action of an ancient group of signaling compounds. *International Journal of Molecular Sciences* **19**:2539.

Werner T, Schmülling T (2009) Cytokinin action in plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **12**:527-538.

- White FF, Jones JB (2018) One effector at a time. *Nature Plants* **4**:134-135.
- Xu X, Chen C, Fan B, Chen Z (2006) Physical and functional interactions between pathogen-induced *Arabidopsis* WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors. *The Plant Cell* **18**:1310-1326.
- Yan J, Li S, Gu M, Yao R, Li Y, Chen J, Yang M, Tong J, Xiao L, Nan F, Xie D (2016) Endogenous bioactive jasmonate is composed of a set of (+)-7-iso-JA-amino acid conjugates. *Plant Physiology* **172**:2154-2164.
- Yan J, Yao R, Chen L, Li S, Gu M, Nan F, Xie D (2018) Dynamic perception of jasmonates by the F-box protein COI1. *Molecular Plant* **11**:1237-1247.
- Yang X, Deng F, Ramonell KM (2012) Receptor-like kinase and receptor-like proteins: keys to pathogen recognition and defense signaling in plant innate immunity. *Frontiers in Biology* **7**:155-166.
- Zamioudis C, Mastranesti P, Dhonukshe P, Blilou I, Pieterse CM (2013) Unraveling root developmental programs initiated by beneficial *Pseudomonas* spp. bacteria. *Plant Physiology* **162**:304–318.
- Zhang S, Xu JR (2014) Effectors and effector delivery in *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathogens* **10**:e1003826.
- Zhong Y, Cheng ZM (2016) A unique RPW8-encoding class of genes that originated in early land plants and evolved through domain fission, fusion and duplication. *Scientific Reports* **6**:32923.
- Zubo YO, Blakley IC, Yamburenko MV, Worthen JM, Street IH, Franco-Zorrilla JM, Zhang W, Hill K, Raines T, Solano R, Kieber JJ, Loraine AE, Schaller GE (2017) Cytokinin induces genome-wide binding of the type-B response regulator ARR10 to regulate growth and development in *Arabidopsis*. *Proceedings of The National Academy of Science USA* **114**:E5995-E6004.

10. Addenda

10.1. Addendum I. Mecanismos moleculares que controlan el desarrollo de los meristemos en plantas.

Capítulo tercero del libro “Fronteras en la biología: señalización y comunicación de las plantas. Editado por la D.C. Elda Beltrán Peña, D.C. José López Bucio y el D.C. Miguel Martínez Trujillo. Con ISBN 978-607-542-028-8.

10.2. Addendum II. De la endosimbiosis a las primeras plantas terrestres.

Artículo de divulgación científica publicado en la revista “Saber Más” de la Coordinación de la Investigación Científica en esta Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Con ISSN-2007-7041.

10.3. Addendum III. Figura adicional 1. Expresión del marcador de AJ JAZ1::JAZ1:GFP activado por la DMHDA en la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

10.4. Addendum IV. Figura adicional 2. Activación sistémica desde la parte aérea del marcador de AJ JAZ10::JAZ10:GFP en la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

10.5. Addendum V. Figura adicional 3. Expresión sistémica del marcador de AJ LOX2::uidA en los cotiledones no heridos.

10.6. Addendum VI. Figura adicional 4. Expresión del marcador de AJ JAZ1::JAZ1:uidA en respuesta a las heridas en los cotiledones.

FRONTERAS EN LA BIOLOGÍA:

SEÑALIZACIÓN Y COMUNICACIÓN DE LAS PLANTAS

Editado por:

Elda Beltrán Peña

Laboratorio de Transducción de Señales

José López Bucio

Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal

Miguel Martínez Trujillo

Laboratorio de Genética y Microbiología

CAPÍTULO 3

Mecanismos moleculares que controlan el desarrollo de los meristemos en plantas

28

Ernesto Vázquez Chimalhua, José López Bucio, Eduardo Valencia Cantero y Elda Beltrán Peña

Introducción

29

1. Características de los meristemos 29
 - 1.1. Actividad y composición del meristemo apical de la raíz 31
 - 1.2. Estructura y función del meristemo del brote apical 31
2. Identidad y mantenimiento del centro quiescente del meristemo apical de la raíz 31
 - 2.1. La expresión de los genes *PLETHORA (PLT)* ubica y mantiene la organización del centro quiescente 31
 - 2.2. La actividad del complejo SHR/SCR regula la identidad del centro quiescente 33
 - 2.3. La expresión de *WOX5* mantiene las características del centro quiescente 34
3. Operatividad del centro organizador del meristemo del brote apical 34
 - 3.1. La expresión de *WUSCHEL* en el centro organizador mantiene el nicho meristemático 35
 - 3.2. Las citocininas promueven el mantenimiento del centro organizador 36
 - 3.3. La expresión del *STM* mantiene al meristemo del brote apical 36

Conclusión

37

Referencias

37

Mecanismos moleculares que controlan el desarrollo de los meristemos en plantas

Ernesto Vázquez Chimalhua, José López Bucio, Eduardo Valencia Cantero y Elda Beltrán Peña

El meristemo apical de la raíz y del brote de las plantas son estructuras que dan origen a tejidos y órganos diferenciados como la raíz, el xilema, el floema, las hojas, los tallos y las flores. En la zona meristemática de la raíz y del brote apical existe un grupo de células iniciales con alta actividad mitótica que se localiza alrededor de un conjunto pequeño de células pluripotentes con escasa división conocido como centro quiescente (CQ) en la raíz y centro organizador (CO) en el brote apical. Al microambiente celular creado por la agrupación de células del CQ o del CO y las células iniciales se le denomina nicho de células fuente. La comunicación entre las diferentes células del nicho mantiene la funcionalidad y, simultáneamente la regulación del tamaño de los meristemos y el desarrollo de los dominios periféricos. En este capítulo, se revisarán los conocimientos actuales sobre los mecanismos moleculares que mantienen el nicho de las células fuente y el tamaño del meristemo, resaltando la relevancia de las células quiescentes sobre estos procesos.

Introducción

Durante la evolución de las plantas terrestres, los meristemos fueron innovaciones morfológicas tan eficientes para su desarrollo que les permitieron la formación de estructuras complejas como la vasculatura, los tallos, las hojas y las raíces (Bennett, 2015). Tanto el meristemo apical de la raíz (MAR) como del brote apical (MBA) presentan una población pequeña de células iniciales indiferenciadas cuya función consiste en generar células diferenciadas destinadas a la formación de tejidos u órganos. La compleja morfología de las plantas está coordinada por las actividades de los meristemos y la organogénesis (Leiboff *et al.*, 2015). Las divisiones de las células iniciales en la zona central del MAR generan células de división rápida, que al ser desplazadas permiten el establecimiento de una zona de transición y posteriormente de una zona de elongación-diferenciación en la raíz (Bitonti y Chiappetta, 2011). En el MBA, la zona periférica al CO (que marca el límite entre la división y la diferenciación) presenta células que eventualmente se diferenciarán en los primordios de las hojas (Skylar y Wu, 2011). Las células meristemáticas son pequeñas y con citoplasmas densos, mientras que las de la zona de transición empiezan a alargarse e inician su diferenciación. Cuando las células transcurren a la zona de elongación adquieren un grado superior de diferenciación, donde los núcleos son empujados por vacuolas grandes hacia la pared celular. Posteriormente, en la zona de diferenciación las células alcanzan su tamaño máximo aunado a una diferenciación específica que da origen a los primordios de órganos (Takatsuka y Umeda, 2013). En la organogénesis, la célula indiferenciada fundadora es la primera destinada a convertirse en algún tipo de tejido u órgano, para lo cual transcurre por una serie de divisiones hasta alcanzar su función específica. En el estado diferenciado, las células pueden responder a señales de activación que dan como resultado un primordio diferenciado, el cual posteriormente formará órganos y tejidos especializados. Es importante notar que las fases de proliferación y diferenciación están espacial y temporalmente separadas (Chandler, 2011).

Las células vegetales presentan una pared rígida, que les impide moverse activamente, sin embargo son desplazadas pasivamente por las divisiones que se llevan a cabo durante el desarrollo de un tejido (Gailochet y Lohmann, 2015). Así que el destino de las células hijas durante y después de la división asimétrica está permanentemente supervisado por factores intrínsecos (ARNs y proteínas) y también por señales extrínsecas (luz y agua) (Hove y Heidstra, 2008). La combinación de las señales externas junto

con la repartición asimétrica de las moléculas internas, van cambiando el destino celular hasta que llegan a la etapa de diferenciación terminal y la formación de un órgano. La capacidad de regular el cambio del destino celular requiere una comunicación continua entre los diferentes dominios funcionales de la planta. El acoplamiento entre la actividad y mantenimiento de los meristemos, junto con la división y diferenciación celular durante la organogénesis, requiere de una transmisión de señales intercelulares a través de los diferentes dominios. En dichas vías de señalización que regulan finamente el desarrollo de las plantas, participan las fitohormonas, péptidos y programas de transcripción genética. El centro quiescente pluripotente, localizado en medio del grupo de células iniciales tiene como función primordial proveer células nuevas al nicho de las iniciales y controlar el destino de las células hijas derivadas de las iniciales, las cuales progresivamente se convertirán en tejidos y órganos diferenciados. Este capítulo se enfoca a la revisión de los mecanismos moleculares que mantienen el nicho de las células fuente y el tamaño del meristemo, poniendo de manifiesto la relevancia de las células quiescentes en dichos procesos. También se discuten algunos defectos en la formación de órganos y tejidos durante el desarrollo de las plantas provocados por un desequilibrio entre la comunicación de las células quiescentes y las iniciales del nicho que lleva a un funcionamiento incorrecto del meristemo.

1. Características de los meristemos

Los meristemos del brote apical y de la raíz son generados durante la embriogénesis. Después de la germinación de la semilla y el desarrollo de las plantas, los meristemos se sitúan en las puntas de los ejes del brote apical y de la raíz (**Fig. 1A**) (Doerner, 2003). Estas estructuras, controlan el número, el tiempo de aparición y la forma de los órganos, todos ellos eventos regulados por el ambiente y el estado genético de la planta (Bennett y Leyser, 2006). Específicamente, en *Arabidopsis* el MBA cambia su identidad para crear a los meristemos axilares (MA), durante la transición de la fase vegetativa a la de floración. Los MA se forman entre el MBA y el primordio de la hoja (Doerner, 2003); dicha zona se caracteriza por presentar una concentración mínima de auxinas. Tal fenómeno quedó de manifiesto en las mutantes *pin1* (uno de los acarreadores de flujo de auxinas) que presentaron una formación defectuosa de los MA (Hofmann, 2014). Posteriormente, durante la fase reproductiva (después de la transición floral), la naturaleza y propiedades de los meristemos axilares nuevamente cambia al crearse los meristemos de las inflorescencias que darán origen a las flores (Benlloch *et al.*, 2007). De hecho, los meristemos laterales

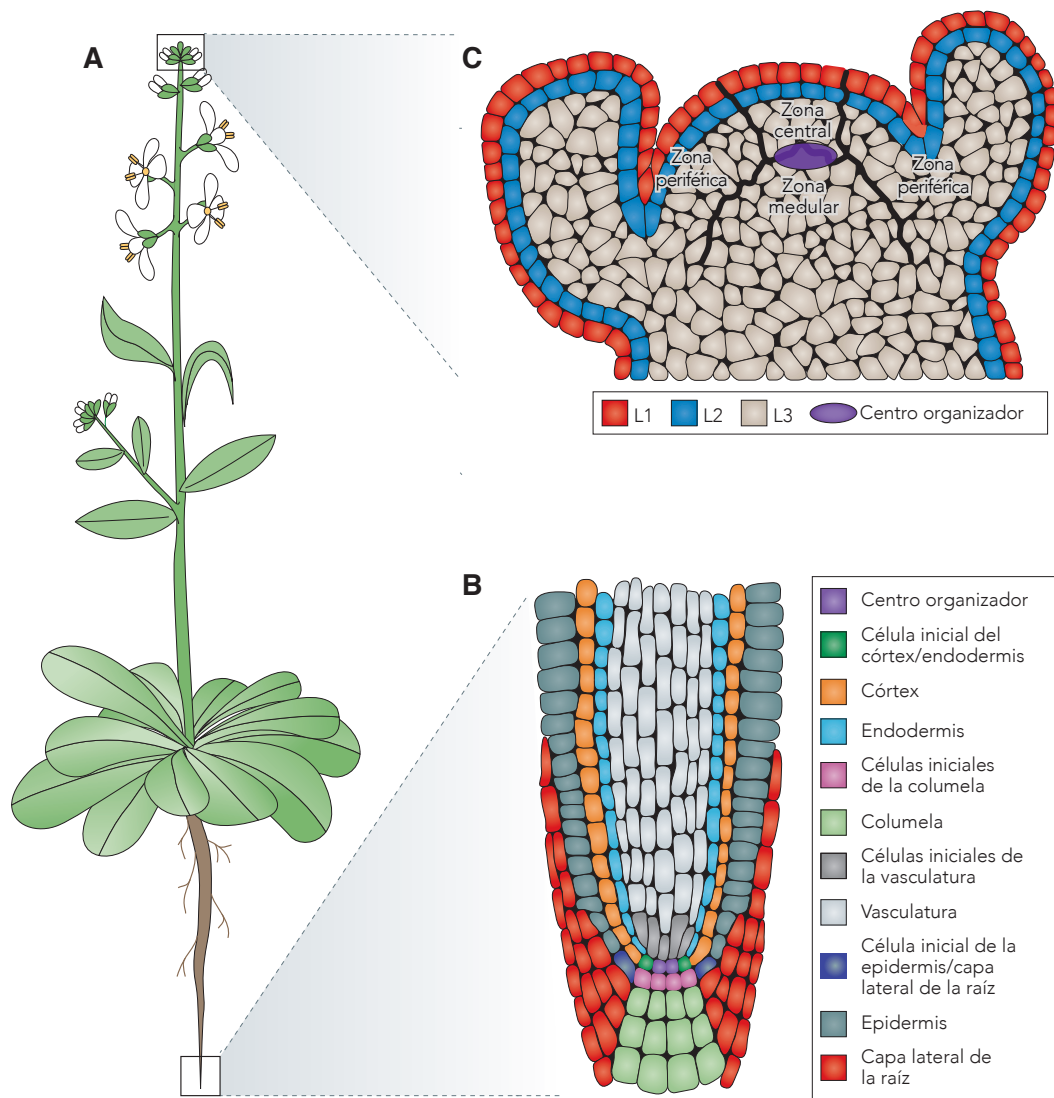


Figura 1. Arquitectura de los meristemos en *Arabidopsis*. (A) La organogénesis depende de los meristemos basal y radicular. (B) El MAR es radialmente simétrico y consiste de un centro de células quiescentes (CQ) rodeado por cuatro tipos de células iniciales (columela, epidermis/capa lateral de la raíz, corteza/endodermis y vasculatura/periciclo). La división de las células iniciales genera linajes celulares que conforman el meristemo, el cual está delimitado hasta la zona transitoria a la elongación/ diferenciación. (C) El MBA contiene tres capas (L1, L2 y L3) y tres zonas de desarrollo: periférica (ZP), central (ZC) y la zona medular (ZM). El centro organizador (CO) se localiza en la conjunción de las tres zonas y mantiene el nicho de células fuente. La división de las células iniciales de la ZC genera células amplificadoras transitorias que forman la ZP y posteriormente se diferencian a un primordio de órgano (PO). Adaptado de Sparks *et al.*, 2013.

axilares y de las inflorescencias son estructuras homólogas, cuyos patrones de expresión genéticos son similares (Bennett y Leyser, 2006). Al contrario del MAB, en el MAR no se observan cambios de identidad durante el desarrollo de la planta (Doerner, 2003), no obstante, ambas estructuras presentan un nicho de células iniciales que al dividirse generan

células nuevas que se diferenciarán en diferentes tipos celulares (Stahl y Simon, 2010). El microambiente del nicho de células fuente, es el responsable del desarrollo pos-embrionario de los órganos completos (Tucker y Laux, 2007). Interesantemente, a pesar de la distancia evolutiva tan grande con las plantas, en el nicho de células madre de animales que sustenta al

tejido específico adulto se conservan factores similares a los que mantienen reprimida la diferenciación del nicho de las células fuente vegetales (Scheres, 2007).

1.1. Actividad y composición del meristemo apical de la raíz

En la base de la raíz se encuentra el MAR, embebido en el interior del meristemo proximal de la raíz donde se localiza el nicho de células fuente. Las células iniciales que forman parte del nicho de células fuente, producen todos los tejidos de la raíz a partir de cuatro tipos celulares: columela, epidermis/capa lateral de la raíz, corteza/endodermis y vasculatura/periciclo. En el corazón del nicho de células fuente se presenta un centro de células quiescentes (CQ) (**Fig. 1B**) que controla el destino de las células iniciales (Ni *et al.*, 2014). En *A. thaliana*, el CQ se compone de cuatro células que raramente se dividen y, que funciona tanto para producir células iniciales como para mantener mitóticamente activas y en estado indiferenciado a las células iniciales que lo rodean (Dinnyen y Benfey, 2008). La división de las células iniciales genera una célula de auto-renovación que mantiene a la inicial y forma a una célula hija; de esta última, se generan células conocidas como amplificadoras transitorias que progresivamente se desplazan hasta alcanzar la zona de transición en la raíz primaria (**Fig. 2A**). Cuando estas células amplificadoras llegan a la zona de elongación y diferenciación adquieren las propiedades específicas del tejido, de tal manera que el crecimiento y desarrollo de la arquitectura de la raíz es sostenido por el MAR (Perilli *et al.*, 2012), donde el mantenimiento y funcionamiento del CQ es vital en la integridad de la raíz. En *A. thaliana*, la relación entre el tamaño de la raíz, el meristemo y el CQ es muy clara. El CQ de otros tipos de raíces presenta diferentes formas que les permite amoldarse al patrón de las células en división (Dubrovsky y Barlow, 2015). Además, en las raíces finas de árboles y plantas herbáceas la existencia del CQ no ha sido confirmada e incluso en determinados cactus no se ha localizado el CQ en la raíz (Barlow, 2015).

1.2. Estructura y función del meristemo del brote apical

El MBA se localiza en la punta del brote apical y comprende tres capas sobrepuestas de células distintas (L1-L3). La L1, al ser la más externa, contacta con el medio ambiente y mediante divisiones anticlinales forma la epidermis. La capa inferior L2 se divide anticlinalmente y genera el tejido fundamental, mientras que la más interna la L3 se divide de forma anticlinal y periclinal produciendo la vasculatura (Gaillochet *et al.*, 2015). En el MAB se observan tres regiones: la zona central (ZC) de baja división

celular, la periférica (ZP) con divisiones celulares más rápidas y la zona medular (ZM) (Skylar y Wu, 2011). La ZC se sitúa dentro de las capas celulares L1-L3 del meristemo donde también se ubican las células iniciales. En la capa L3 localizada en base del meristemo, yace el centro organizador (CO) (**Fig. 1C**), el cual, al igual que el CQ del MAR rara vez se divide (Gaillochet y Lohmann, 2015). Para ser incorporados a los primordios de hojas o tallo, los linajes de células derivadas de las divisiones de las células iniciales en la ZC requieren ser impulsados lateralmente hacia la ZP o en forma basal hacia la ZM (Wyrzykowska *et al.*, 2006). El CO a pesar de ser un núcleo con escasas células quiescentes, tiene un efecto directo sobre las células vecinas iniciales de la ZC, las cuales son las células fundadoras de los dominios diferenciados de las plantas. El CO está implicado en varias funciones: sustentar a las células iniciales, aumentar el proceso mitótico y controlar la pluripotencia de la zona, por tal motivo la actividad y mantenimiento del CO regula el tamaño del meristemo y por consecuencia el funcionamiento correcto del MBA (Ueda *et al.*, 2004; Daum *et al.*, 2014).

2. Identidad y mantenimiento del centro quiescente del meristemo apical de la raíz

El número de células en el CQ varía entre las especies de plantas, en maíz *Zea mays* es de 500 hasta 1200 células y en *Arabidopsis* como se mencionó antes está formado solo por cuatro células (Heyman *et al.*, 2014). En maíz, las células del CQ se encuentran detenidas en la fase G1 del ciclo celular hasta por 150 h, a diferencia de las células iniciales que lo rodean, donde la misma fase dura alrededor de 2 h o menos (Clowes, 1965). Se ha observado que la eliminación de células de la raíz al tratarlas con rayos X provoca el acortamiento de la raíz, además de activar la división celular del CQ y detenerla en las células iniciales circundantes (Barlow, 2015). En *A. thaliana*, la eliminación del CQ con un rayo láser indujo la diferenciación de las células iniciales (van den Berg *et al.*, 1997). Así que, mientras las células del CQ permanezcan latentes e indiferenciadas, las iniciales circundantes serán mitóticamente activas con un grado de diferenciación incipiente. Lo antes mencionado, comprueba que para mantener el nicho de células fuente, se requiere de una conexión de señales de corta distancia entre las células que lo forman.

2.1. La expresión de los genes *PLETHORA* (*PLT*) ubica y mantiene la organización del centro quiescente

La posición exacta del nicho de células fuente desde el desarrollo embrionario hasta el pos-embrionario, está determinada en gran parte por las auxinas. A

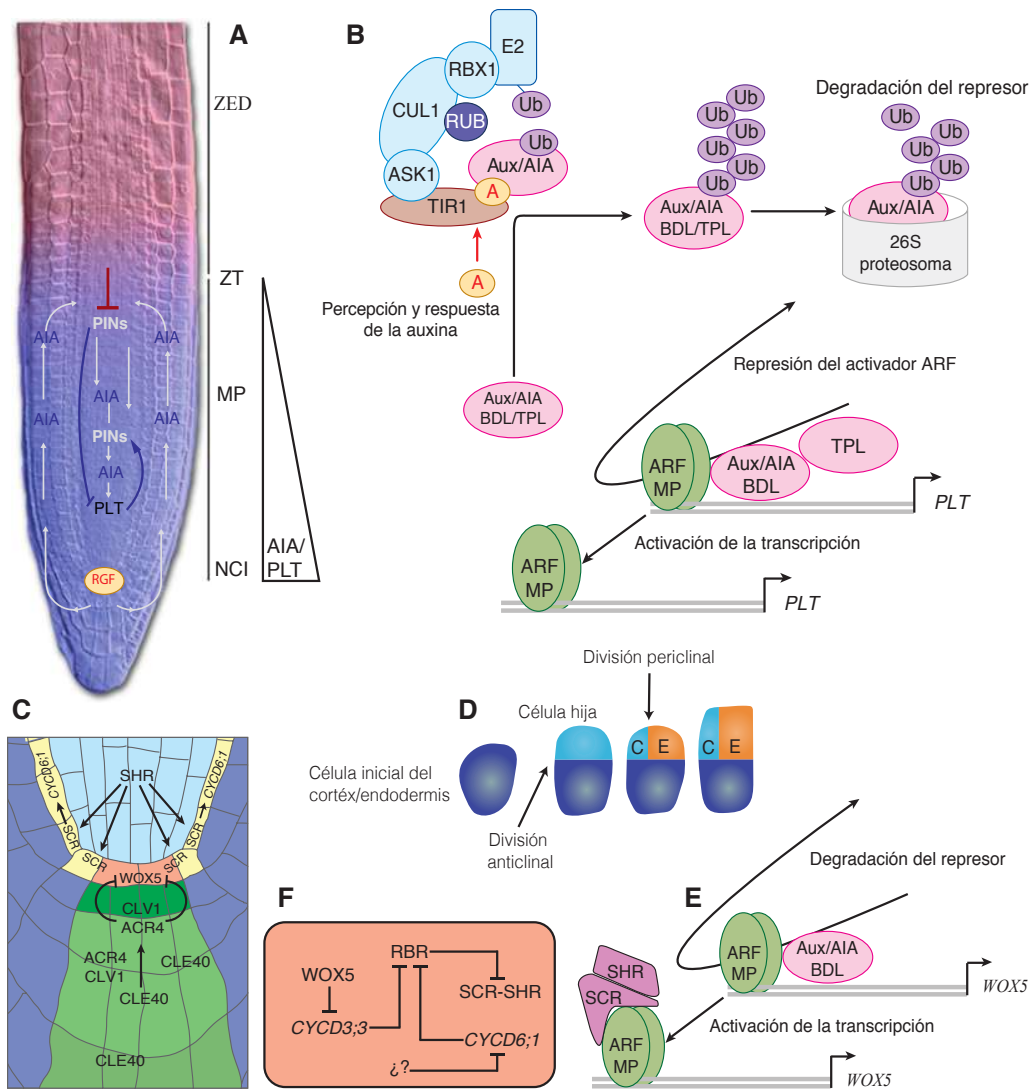


Figura 2. Mecanismos moleculares que controlan el MAR. (A) El mantenimiento del nicho celular depende de la actividad de las proteínas PLT. La expresión de los genes *PLT* es inducida por las auxinas y está restringida por los transportadores de flujo de auxinas PIN, a su vez las PLTs activan la transcripción de los *PIN* y por lo tanto el transporte polar del AIA. Los péptidos RGF también controlan pos-transcripcionalmente la expresión de *PLT* en el nicho de células iniciales (NCI). MP (Meristemo proximal), ZT (Zona de transición), ZED (Zona de elongación/diferenciación). (B) La transcripción de los *PLT* está regulada por el cofactor TPL y las auxinas mediante la degradación de BDL/IAA12 y la subsecuente liberación del factor transcripcional MONOPTEROS (MP)/ARF5. (C) *SHR* se expresa en la estela y se mueve hacia la endodermis, la célula inicial del tejido fundamental y el centro quiescente donde activa la expresión de *SCR*. En el tejido endodérmico, el complejo SHR-SCR activa la expresión de *CYCD6;1* promoviendo la división celular, mientras que en el CQ activa la expresión de *WOX5*. CLE40 es expresado en las células diferenciadas de la columela donde actúa vía su receptor ACR4. La señal intracelular formada por CLE40-ACR4 reprime la expresión de *WOX5*, limitando así su dominio de expresión. (D) La célula inicial, primero crece y después se divide reproduciéndose ella misma y una hija, esta última a su vez, se divide para producir los linajes celulares del córtex y la endodermis. (E) La expresión de *WOX5* es activada por el complejo SHR-SCR y conjuntamente regulada por el AIA vía MP/BDL. (F) La escasa división del centro quiescente, en parte está controlada por WOX5 al reprimir la expresión de *CYCD3;3*. SHR-SCR activa la expresión de *CYCD6;1* pero la proteína RBR inactiva al complejo SHR-SCR. La interacción RBR-SHR-SCR es interrumpida por los complejos CYCD6;1-CDKA;1 y CYCD3;3-CDKA;1 que fosforilan a RBR. Adaptado de Helariutta *et al.*, 2000; Mockaitis y Estelle 2008; Aichinger *et al.*, 2012; Perilli *et al.*, 2012; Polyn *et al.*, 2015.

partir de la acumulación máxima de auxinas en el CQ, se establece un gradiente de auxinas a lo largo de la punta de la raíz que correlaciona con el patrón de expresión de los genes *PLETHORA* (*PLT*), que codifican para factores de transcripción miembros de una familia de proteínas que presentan un dominio AP2 (**Fig. 2A**) (Aida *et al.*, 2004). Los análisis de expresión de los genes *PLT* han mostrado que ellos definen la programación de las células iniciales, la actividad mitótica y la diferenciación celular en el meristemo. El dominio de actividad de las *PLT* se extiende hasta las células amplificadoras transitorias (**Fig. 2A**). Las mutantes sencillas *plt1* o *plt2* presentan pérdida de identidad de las células iniciales, lo que ocasiona un incremento en la diferenciación y el número de filas celulares de la columela, mientras que la triple mutante *plt1 plt2 plt3* no presenta raíz (Galinha *et al.*, 2007; Li y Xue, 2011). En contraste, la expresión ectópica de los genes *PLT1* o *PLT2* resulta en la proliferación de las células iniciales, así como en la formación ectópica de nichos de células fuente (Galinha *et al.*, 2007; Dinneny y Benfey, 2008). La expresión de los genes *PLT3*, *PLT5* y *PLT7* durante la formación de los primordios de las raíces laterales está regulada por los factores de transcripción de respuesta a auxinas ARF7/ARF19 (Hofhuis *et al.*, 2013). El dominio de actuación de los *PLT* está limitado por los transportadores de eflujo de auxinas PIN, los cuales controlan la concentración de auxinas (**Fig. 2A**). A su vez, los factores *PLT* mantienen la transcripción de los genes *PIN*, ayudando así a la estabilización del nicho de células iniciales en la raíz de *A. thaliana* (Blilou *et al.*, 2005). Específicamente, la transcripción de los genes *PLT1* y *PLT2* depende del *ARF5/MONOPTEROS* (*MP*), además el promotor de los *PLT* es el objetivo directo del co-represor de la respuesta a auxinas TOPLESS (*TPL*) a través del complejo *PLT-BDL* (Smith y Long 2010). (**Fig. 2B**). También, se ha reportado que un pequeño grupo de péptidos sulfatados en tirosina conocidos como Root Growth Factor (RGFs) mantienen el nicho de células iniciales después del desarrollo embrionario, al definir el dominio de expresión de los *PTL* (**Fig. 2A**) (Matsuzaki *et al.*, 2010; Li y Xue, 2011). Los RGFs son expresados en el área de las células iniciales y la primera capa celular de la columela (Perilli *et al.*, 2012).

2.2. La actividad del complejo SHR/SCR regula la identidad del centro quiescente

El complejo de las proteínas SHORT-ROOT (*SHR*)/SCARECROW (*SCR*) también ubica la posición del nicho de las células fuente. Los genes *SHR* y *SCR* codifican para factores transcripcionales miembros de la familia GRAS (acrónimo de los genes *GAI*, *RGA*,

SCR). Ambas mutantes *shr* o *scr* muestran un fenotipo de raíz corta y pérdida de las capas de la endodermis y el córtex y solo en *shr* el destino de la endodermis se pierde totalmente (Long, 2015). *SHR* se expresa en el procambium durante la embriogénesis, y en el desarrollo pos-embrionario en la estela (cilindro vascular y periciclo) pero no en las células iniciales córtex/endodermis ni en las del CQ. La diferencia entre el dominio de expresión y actuación indica que la organización radial del tejido fundamental depende de un mecanismo no autónomo, es decir, la proteína se sintetiza en un tejido y viaja a otro donde lleva a cabo su función (**Fig. 2C**). Normalmente la célula inicial del tejido fundamental se divide anticlinalmente para reproducirse ella misma y a una célula hija, esta última, posteriormente se divide periclinalmente para formar los linajes celulares de la endodermis y el córtex (**Fig. 2D**). En la mutante *shr-1*, la célula inicial del córtex/endodermis se localiza en su posición correcta, donde se divide anticlinalmente, sin embargo, la célula hija ya no puede dividirse lo que sugiere que *SHR* es requerida en la división que forma el tejido fundamental, llevando información célula-célula a corta distancia a partir de la estela (Helariutta *et al.*, 2000). La proteína *SHR* en la estela se localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo; posteriormente *SHR* se desplaza hacia la endodermis, la célula inicial córtex/endodermis y la capa adyacente del CQ, donde se ubica en el núcleo con ayuda de la proteína *SCR* (Aichinger *et al.*, 2012). El complejo *SHR/SCR* a su vez activa la transcripción de *SCR* (Nakajima *et al.*, 2001). En la embriogénesis el gen *SCR* se expresa en la célula precursora del CQ, después en la etapa pos-embrionaria, su dominio de expresión se extiende a la célula inicial del tejido fundamental y a su célula hija (**Fig. 2C**). *SCR* se expresa en la célula hija antes de su división asimétrica, después de la división persiste su expresión en la capa celular endodérmica. En las mutantes *scr-1* tampoco ocurre la división asimétrica de la célula hija de la inicial córtex/endodermis, lo que resulta en una sola capa celular de identidad mixta. Interesantemente, en la mutante *scr-1*, el CQ tiene forma aberrante y la raíz cesa de crecer, mostrando que *SCR* mantiene tanto la identidad del CQ como la de las células iniciales (Helariutta *et al.*, 2000; Sabatini *et al.*, 2003). La combinación de la actividad de *PLT* junto con el heterodímero *SHR/SCR* (Dinneny y Benfey, 2008) posicionan al CQ de manera longitudinal y radial respectivamente (Heyman *et al.*, 2014). Al mismo tiempo, *SCR* controla la actividad de las células iniciales y la diferenciación de su progenie, al prevenir la expresión de *ARR1* (factor de transcripción regulado por las citocininas) en el CQ e incluso controlando la expresión de *ARR1* hasta la zona de transición de forma no autónoma vía

auxinas (Moubayidin *et al.*, 2013).

2.3. La expresión de *WOX5* mantiene las características del centro quiescente

El mantenimiento del nicho de células fuente en el MAR se establece por la expresión de *WOX5*, cuyo producto génico es un factor transcripcional que preserva el estado indiferenciado del CQ y la identidad de las células iniciales que lo rodean. Durante la embriogénesis, *WOX5* se expresa en la hipófisis mediante su activación transcripcional por el complejo SHR/SCR/MP, el cual se forma cuando se degrada el represor BDL a través de la señalización auxínica (Fig. 2E); en las mutantes *shr*, *scr*, *mp* o *bdl*, la expresión de *WOX5* es casi indetectable. A su vez, la transcripción de *WOX5* está confinada por la expresión de *CLAVATA3/EMBRYO-SURROUNDING REGION 40* (*CLE40*) que codifica para el péptido pequeño CLE40. *CLE40* se expresa en las células de la columela donde promueve su diferenciación (Fig. 2C). La mutante *cle40-2* contiene una capa extra de células iniciales de columela en la fila D2, donde deberían localizarse células de columela diferenciadas. Así que, la diferenciación de las células hijas está retrasada y también se presenta una expansión del dominio de expresión de *WOX5*. Por el contrario, la adición del péptido sintético CLE40p de manera dosis dependiente, estimula la diferenciación de las células iniciales de la capa D1 de la columela. Estas observaciones sugieren que la reducción de la actividad de CLE40 permite la proliferación de las células iniciales, mientras que su incremento promueve la diferenciación de las células distales (Stahl *et al.*, 2009). CLE40 es percibido por el complejo de receptores tipo cinasa ARABIDOPSIS CRINKLY 4 (ACR4) y CLAVATA1 (CLV1) de la membrana plasmática (Fig. 2C). Dichos complejos, preferencialmente se localizan en los plasmodesmos donde regulan directamente la movilidad de factores derivados del CQ como *WOX5*. En forma similar a *cle40*, las mutantes *acr4* y *clv1* también presentaron una capa adicional de células iniciales de columela (Stahl *et al.*, 2013; Richards *et al.*, 2015). Lo anterior, indica que el efecto regulador directo de la señal CLE40-ACR4-CLV1 actúa río arriba sobre el dominio de expresión de *WOX5* (Fig. 2C), y se ha sugerido que este podría ser un mecanismo de regulación del destino celular independiente de *WOX5*, debido a que CLE40p aumenta la diferenciación de las células iniciales de la columela aún en las mutantes *wox5*, donde ya existe diferenciación celular en las células iniciales (Pallakies y Simon, 2014). El factor *WOX5* puede retrasar la división celular en el CQ al reprimir la expresión de *CYCD3;3* (ciclina que regula el ciclo celular) (Fig. 2F), manteniendo así su

quiescencia. En tanto que en la columela las ciclinas *CYCD3;3* y *CYCD1;1* promueven la proliferación celular (Forzani *et al.*, 2014). La división en el CQ depende de la actividad de SCR, debido a que la proteína RETINOBLASTOMA-RELATED (RBR) al unirse a SCR y formar el complejo RBR-SCR-SHR lo inactiva, impidiendo así la división asimétrica y preservando la quiescencia de CQ (Fig. 2F). En el tejido maduro de la endodermis, el complejo CDK-CYCD6;1 fosforila a RBR e interrumpe la interacción RBR-SCR-SHR, y a su vez SCR y SHR activan la expresión de *CYCD6;1* (Fig. 2C). En el CQ no hay expresión de *CYCD6;1*, lo cual puede deberse a un factor inhibidor desconocido del circuito SCR-SHR (Fig. 2F), posiblemente la división asimétrica del CQ esté controlada por otras ciclinas que al formar un complejo con la CDK fosforilan a la proteína RBR (Cruz-Ramírez *et al.*, 2012; Cruz-Ramírez *et al.*, 2013; Heidstra y Sabatini, 2014).

3. Operatividad del centro organizador del meristemo del brote apical

Las plantas para adaptarse a los cambios ambientales modifican la producción y tamaño de los órganos como las flores y hojas (Weiss *et al.*, 2016). El MBA produce planos corporales morfológicamente complejos mediante la coordinación de la actividad de las células iniciales y la organogénesis de hojas o brotes (Leiboff *et al.*, 2015). El MBA de *A. thaliana* consiste de alrededor de 500 células (Yadav *et al.*, 2011), donde en la ZC yacen las células iniciales con escasa actividad mitótica y en la ZP se localizan células con mayor división llamadas células amplificadoras transitorias (AT). Las AT son las células fundadoras de los primordios de órganos. El nicho de células fuente es mantenido por un núcleo celular quiescente denominado centro organizador (CO) que subyace en la base de la ZC, mientras que por debajo de él se origina la zona medular (ZM) meristemática del tejido vascular. Todas las células de los brotes apicales formados pos-embriónicamente derivan de tres células iniciales localizadas en cada una de las capas de la ZC (Boscá *et al.*, 2011). Un número limitado de células iniciales es mantenido y sus hijas son posicionadas en la ZP (Fig. 1C). Durante el desarrollo, las células AT de la ZP entran a una diferenciación mayor iniciando la formación de los primordios de los órganos laterales (Fig. 1C) (Stahl y Simon, 2010). Se ha sugerido, que la regulación de la velocidad de división de las células iniciales es indispensable para la transición oportuna de las células hijas hacia su diferenciación; en este contexto, se vuelve importante entender el mecanismo molecular que mantiene el nicho de células iniciales (Yadav *et al.*, 2013). La eliminación del nicho de células iniciales desencadena en las células circundantes una

reprogramación génica y la formación *de novo* de un nicho de células iniciales que empiezan a expresar al gen *WUSCHEL* (Gaillochet y Lohmann, 2015). Lo anterior, demuestra que el destino celular está determinado tanto por la comunicación célula-célula, como por la posición actual de las células y no por una herencia de linaje. En consecuencia, los patrones de formación del meristemo ocurren mediante una auto-organización y no dependen de un punto estable de referencia (Adibi *et al.*, 2015).

3.1. La expresión de *WUSCHEL* en el centro organizador mantiene el nicho meristemático

La expresión del factor de transcripción homeótico *WUSCHEL* (*WUS*) inicia en el estado embrionario de 16 células y gradualmente se va restringiendo al centro del meristemo embrionario, donde se expresa solamente en 25-30 células del CO (Schoof *et al.*, 2000; Yadav *et al.*, 2011). En el CO, después del desarrollo embrionario, *WUS* reprime directamente la transcripción de los genes que codifican para los factores transcripcionales ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS (ARR5, ARR6, ARR7 y ARR15) tipo A que funcionan como represores de

la respuesta a citocininas (CK) (Fig. 3B). Los genes *ARR* tipo A controlan negativamente el tamaño del meristemo y su represión es necesaria para el correcto funcionamiento del meristemo (Leibfried *et al.*, 2005). *WUS* es importante para mantener la identidad tanto del CO como de las células iniciales; mutantes *wus* muestran una pérdida de identidad de las células iniciales y una terminación prematura de los brotes y las flores después de su formación (Schoof *et al.*, 2000). El factor *WUS* limita su dominio de expresión al viajar a través de los plasmodesmos hacia el interior de las células iniciales para activar la transcripción de *CLV3* (Fig. 3B y C) (Yadav *et al.*, 2011). *CLV3* codifica para un pequeño péptido de 13 amino ácidos, el cual se expresa en las tres capas (L1-L3) de la ZC y es secretado al espacio extracelular (Yadav *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2013). *CLV3* se une al dominio de los receptores CLAVATA1 (*CLV1*), CLAVATA2 (*CLV2*), CORYNE (CRN)/ SUPPRESSOR OF *LLP1* 2 (*SOL2*) y RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE (*RPK2*) para activar una vía de señales que reprime la expresión de *WUS* (Fig. 3B). Así, se presenta un ciclo de retroalimentación negativa en el que *WUS* expresa su propio represor (Schoof *et al.*, 2000; Song

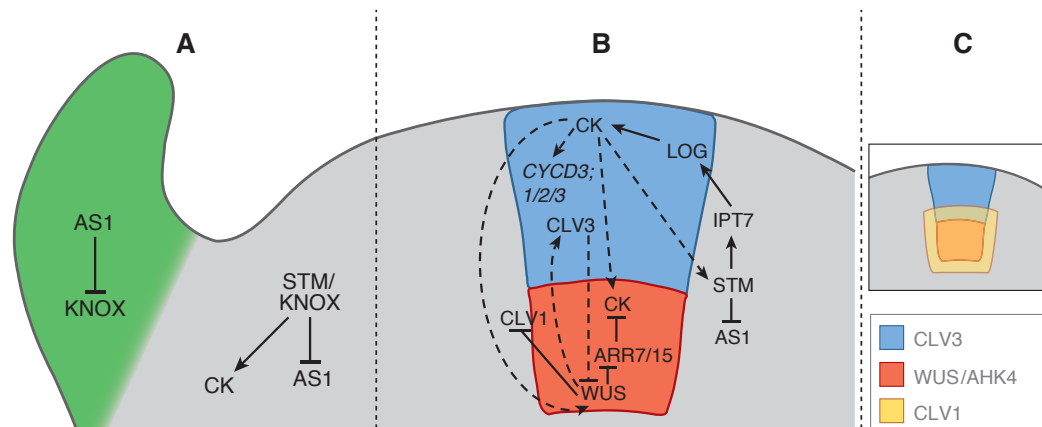


Figura 3. Mecanismos moleculares que controlan el MBA. (A) Regulación entre los límites del meristemo y los primordios de órganos. AS1 reprime la expresión de *KNOX* para iniciar la diferenciación de los primordios de órganos, mientras que en el domo del meristemo, STM/*KNOX* mantienen la indiferenciación reprimiendo la expresión de *AS1*. El área verde indica la concentración máxima de auxinas en el primordio de órgano. (B) El nicho de células iniciales (azul) es mantenido por la actividad de STM y por el circuito negativo WUS-CLV3. STM activa la transcripción de *IPT7* que cataliza la biosíntesis de CK. *LONELY GUY* (*LOG*) sintetiza a la CK activa en la capa más externa del meristemo. La CK promueve la expresión de los genes miembros de la familia *CYCD3* y de *STM*. La CK activa se mueve de la capa externa L1 del meristemo hacia el CO (rojo) donde promueve la expresión de *WUS*. El factor transcripcional *WUS* mantiene la identidad de las células en el centro organizador inhibiendo la transcripción de los represores de la señal de la CK, *ARR7/15*. También *WUS* regula negativamente la expresión del receptor *CLV3* (el cual a su vez inhibe la expresión de *WUS*) para sostener su propia expresión. El color gris del meristemo indica la predominancia de la CK. (C) El dominio de expresión de *CLV1* (área amarilla) se traslapa con el dominio de *WUS*, aunque, *CLV1* se alcanza a expresar alrededor del CO y la zona medular. El CO tiene alta sensibilidad a la CK debido a que la expresión de *AHK4* se superpone con la de *WUS*. Modificado de Aichinger *et al.*, 2012.

et al., 2012). En mutantes *clv*, el dominio de expresión de *WUS* se incrementa y la iniciación de órganos se retrasa, mientras que en mutantes dobles de *clv*, la expresión ectópica de *WUS* provoca un sobrecrecimiento del meristemo, demostrando que los genes *CLV1*, *CLV2*, *CLV3* delimitan el dominio de expresión de *WUS*, y simultáneamente promueven la progresión de las células meristemáticas hacia la iniciación de órganos (Schoof *et al.*, 2000). Por otra parte, *CLV1* se expresa en la capa L3 de la ZC (dominio de *WUS*) y todavía se detecta en las células laterales y en la ZM (Fig. 3C). Sin embargo, *WUS* reprime directamente la expresión de *CLV1*, reduciendo el efecto de *CLV3*, lo que establece un ciclo de auto-regulación positivo, que sustenta su propia expresión en el CO (Fig. 3B) (Schoof *et al.*, 2000; Heidstra y Sabatini, 2014). Es importante señalar que *WUS* también reprime la expresión de los genes de diferenciación celular *ASYMMETRIC LEAVES 2 (AS2)*, *BREVI-PEDICELLUS (BP)*, *KANADI 1 (KNAT1)* y *SCR* (Yadav *et al.*, 2013).

3.2. Las citocininas promueven el mantenimiento del centro organizador

Las citocininas (CK) sitúan al CO y mantienen el desarrollo del meristemo al inducir la expresión de *WUS* (Fig. 3B) y disminuir la de *CLV1* (Gordon *et al.*, 2009; El-Showk *et al.*, 2013). En mutantes *clv3*, las CK inducen un aumento de tamaño del meristemo lo que significa que la vía de señalización *CLV3-CLV1* actúa como amortiguador de los efectos de las CK (Heidstra y Sabatini, 2014). *WUS* en el CO, reprime la expresión de los genes *ARR* tipo A y contradictoriamente su sobre-expresión reduce los niveles del transcrito de *WUS* mimetizando el fenotipo de la mutante *wus* (Gordon *et al.*, 2009). En el MBA, existe una concentración alta de CK que mantiene indiferenciadas a las células del CO y de la ZM, mientras que en la ZP se localiza un máximo de auxinas que permite la inducción del brote y la diferenciación de órganos (Fig. 3A y B). Simultáneamente, el dominio de expresión de *WUS* se traslapa con el de *AHK4* dentro del meristemo en la ZM (Fig. 3C), sensibilizando a un grupo de células que sintetizan a las CK (Chickarmane *et al.*, 2012; Schaller *et al.*, 2014). En *A. thaliana*, *LOG4* es una de las enzimas que participa en la síntesis de las CK y que se localiza específicamente en la capa epidérmica L1 (Fig. 3B), no obstante, la producción de CK es regulada negativamente en parte por la actividad de *WUS*. Comparativamente en arroz, *LONELY GUY (LOG)* media la síntesis de las CK hasta la segunda o tercera capa externa del meristemo (Chickarmane *et al.*, 2012; Adibi *et al.*, 2015). Las CK activas se difunden de la epidermis en la punta del

meristemo hacia la ZM, alcanzando un máximo de concentración en el CO (Fig. 3B), el cual regula la expresión de *WUS* (Schaller *et al.*, 2014). En arroz, *LOG* se expresa en un grupo celular discreto en todos los meristemas de la panícula en desarrollo, incluyendo los meristemas laterales y florales. Las mutantes *log* presentan un meristemo pequeño con un tamaño de la panícula reducido y una disminución en el número de órganos florales. Sorpresivamente, se observó que los niveles de CK aumentan debido al descontrol de la retroalimentación negativa generada por los genes *ARR* tipo A (Zhao, 2008).

3.3. La expresión del STM mantiene al meristemo del brote apical

Los genes *SHOOTMERISTEMLESS (STM)* en *Arabidopsis* y *KNOTTED1 (KNI)* en maíz codifican para factores transcripcionales de la familia KNOX1 que previenen la diferenciación y endoreduplicación a través de las CK. Ambos genes se expresan específicamente en el domo del meristemo y no en los órganos laterales ni en las células fundadoras de los primordios de órganos. Los factores KNOX1 se posicionan río arriba de la síntesis de CK, debido a que *STM*, *KNAT2* (de *Arabidopsis*) y *KN1* inducen exclusivamente la expresión del gen *IPT7* que codifica para una de las enzimas implicadas en la síntesis de CK (Fig. 3B) (Yanai *et al.*, 2005; Skylar y Wu, 2011). Sucesivamente las CK inducen la expresión de *STM*, formando un ciclo de retroalimentación positiva, y también promueven la expresión de tres genes miembros de la familia de las ciclinas *CYCD3 (CYCD3;1/2/3)* (Fig. 3B). Así que *STM* actúa a través de las CK para transcribir a las ciclinas D, que al ejercer un control sobre el ciclo celular, estimulan la iniciación de los ciclos mitóticos e inhiben los endociclos (Schofield *et al.*, 2013; Schaller *et al.*, 2014). En las mutantes alélicas de *stm* fuertes, intermedias y débiles se logran formar las hojas, tallos y flores, sin embargo, los MBA dan origen a primordios fusionados que terminan en una filotaxis aberrante de los órganos centrales ectópicos. Los órganos aberrantes se forman debido a que las células meristemáticas centrales de los brotes se diferenciaron e incorporaron en un primordio ectópico. También los meristemas florales presentaron defectos parecidos, que finalizaron prematuramente en estambres centrales, por lo que se deduce que en las mutantes *stm* se agotaron las células centrales de los meristemas florales y de brotes. Se ha reportado que *STM* también ayuda a definir los límites entre el meristemo y los primordios de órganos (Fig. 3A). En las células fundadoras de hojas, es necesario reprimir la expresión de *STM* para obtener el correcto desarrollo de hojas en plantas como maíz y *A. thaliana*. La proteína *STM* interacciona de manera

antagónica con el factor transcripcional MYB AS1 (miembro de los factores ARP), el cual forma un heterodímero con la proteína AS2 que presenta un dominio LOB (Lateral Organ Boundaries) el cual se une a la región promotora de los genes *BP* y *KNAT2* tipo *KNOX1* (**Fig. 3A**) (Hay y Tsiantis, 2010). Por el contrario, en el meristemo *STM* reprime la expresión de *AS1* para mantener el estado de indiferenciación celular (**Fig. 3A**) (Zhou *et al.*, 2014).

Conclusión

El centro celular quiescente en los meristemas abastece al nicho de células iniciales y consolida un dominio fisiológico diferente, a partir del cual se originan los tejidos y órganos diferenciados. Dicho dominio se caracteriza por presentar células indiferenciadas que mantienen una tasa de división baja, en comparación con las células adyacentes. Para mantener este nicho de células iniciales y quiescentes se necesitan programas que regulen el desarrollo y la pluripotencia celular. El centro quiescente es de gran relevancia y para conservar ese estado expresa *WUS* o su gen relacionado *WOX5*, requeridos para el mantenimiento del nicho celular del MBA y del MAR respectivamente. Por otra parte, las células iniciales también expresan genes como los de la familia *CLV*, los cuales regulan a las proteínas del centro quiescente, permitiendo un intercambio de información entre las diferentes regiones del nicho. Otras relaciones importantes son las del complejo SHR-SCR que regula el ciclo celular en el CQ vía la expresión no autónoma de *WOX5* o *STM* que indirectamente a través de la señalización de las CK, activan la transcripción de las ciclinas D. Lo antes mencionado, demuestra que existen interacciones muy complicadas entre las diferentes regiones del nicho. Como el estado del nicho de las células fuente influye en el tamaño del meristemo, si en las células quiescentes sucede un desajuste operativo las células iniciales funcionarán incorrectamente; este desajuste provocará desde una diferenciación prematura del meristemo hasta una desregulación del ciclo celular y la formación de órganos ectópicos, e incluso podría afectar a las zonas de elongación y diferenciación.

Referencias

- Adibi M, Yoshida S, Weijers D, Fleck C** (2015) Centering the organizing center in the *Arabidopsis thaliana* shoot apical meristem by a combination of cytokinin signaling and self-organization. *Plos One* 11: e0147830.
- Aichinger E, Kornet N, Friedrich T, Laux T** (2012) Plant stem cell niches. *Annu Rev Plant Biol* 63: 615-636.
- Aida M, Beis D, Heidstra R, Willemsen V, Blilou I, Galinha C, Nussaume L, Noh YS, Amasino R, Scheres B** (2004) The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* 119: 109-120.
- Barlow PW** (2015) Origin of the concept of quiescent centre of plant roots. *Protoplasma* 253: 1283-1297.
- Benlloch R, Berbel A, Serrano-Mislata A, Madueño F** (2007) Floral initiation and inflorescence architecture: A comparative view. *Annals Bot* 100: 659-676.
- Bennett T** (2015) PIN proteins and the evolution of plant development. *Trends Plant Sci* 20: 498-507.
- Bennett T, Leyser O** (2006) Something on the side: axillary meristems and plant development. *Plant Mol Biol* 60: 843-854.
- Bitonti MB, Chiappetta A** (2001) Root apical meristem pattern: Hormone circuitry and transcriptional networks. *Prog Bot* 72: 37-71.
- Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K, Scheres B** (2005) The PIN auxin efflux facilitator networks controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 433: 39-44.
- Bosca S, Knauer S, Laux T** (2011) Embryonic development in *Arabidopsis thaliana*: from the zygote division to the shoot meristem. *Front Plant Sci* 2: 93.
- Chandler JW** (2011) Founder cell specification. *Trends Plant Sci* 16: 607-613.
- Chickarmane VS, Gordon SP, Tarr PT, Heisler MG, Meyerowitz EM** (2012) Cytokinin signaling as a position cue for patterning the apical-basal axis of the growing *Arabidopsis* shoot meristem. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 4002-4007.
- Clowes FAL** (1965) The duration of G1 phase of the mitotic cycle and its relation to radiosensitivity. *New Phytol* 64: 355-359.
- Cruz-Ramírez A, Díaz-Triviño S, Blilou I, Grieneisen VA, Sozzani R, Zamioudis C, Miskolczi P, Nieuwland J, Benjamins R, Dhonukshe P, Caballero-Pérez J, Horvath B, Long Y, Mähönen AP, Zhang H, Xu J, Murray JAH, Benfey PN, Bako L, Marée AFM, Scheres B** (2012) A bistable circuit involving SCARECROW-RETINOBLASTOMA integrates cues to inform asymmetric stem cell division. *Cell* 150: 1002-1015.
- Cruz-Ramírez A, Díaz-Triviño S, Wachsman G, Du Y, Arteaga-Vázquez M, Zhang H, Benjamins R, Blilou I, Neef AB, Chandler V, Scheres B** (2013) A SCARECROW-RETINOBLASTOMA protein network controls protective quiescence in *Arabidopsis* root stem cell organizer. *Plos Biol* 11: e1001724.
- Daum G, Medzihradsky A, Suzuki T, Lohmann JU** (2014) A mechanism framework for noncell autonomous stem cell induction in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 14619-14624.
- Dinneny JR, Benfey PN** (2008) Plant stem cell niches: Standing the test of time. *Cell* 132: 553-557.
- Doerner P** (2003) Plant meristems: A merry-go-round of signals. *Curr Biol* 13: 368-374.
- Dubrovsky JG, Barlow PW** (2015) The origins of the quiescent centre concept. *New Phytol* 206: 493-496.
- El-Showk S, Ruonala R, Haleriuotta Y** (2013) Crossing paths: cytokinin signaling and crosstalk. *Development* 140: 1373-1383.
- Forzani C, Aichinger E, Sornay E, Willemsen V, Laux T, Dewitte W, Murray JAH** (2014) *WOX5* suppresses

- CYCLIN D* activity to establish quiescence at the center of the root stem cell niche. *Curr Biol* 24: 1939-1944.
- Gaillochet C, Daum G, Lohmann JU** (2015) O Cell, Where Art Thou? The mechanisms of shoot meristem patterning. *Curr Opin Plant Biol* 23: 91-97.
- Gaillochet C, Lohmann JU** (2015) The never-ending story: from pluripotency to plant developmental plasticity. *Development* 142: 2237-2249.
- Galinha C, Hofhuis H, Luijten M, Willemsen V, Blilou I, Heidstra R, Scheres B** (2007) PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development. *Nature* 449: 1053-1057.
- Gordon SP, Chickarmane VS, Ohno C, Meyerowitz EM** (2009) Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the *Arabidopsis* shoot meristem. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 16529-16534.
- Hay A, Tsiantis M** (2010) *KNOX* genes: versatile regulators of plant development and diversity. *Development* 137: 3153-3165.
- Heidstra R, Sabatini S** (2014) Plant and animal stem cells: similar yet different. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 301-312.
- Helariutta Y, Fukaki H, Wysocka-Diller J, Nakajima K, Jung J, Sena G, Hauser MT, Benfey PN** (2000) The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell* 101: 555-567.
- Heyman J, Kumpf RP, De Veylder L** (2014) A quiescent path to plant longevity. *Trends Cell Biol* 24: 443-448.
- Hoffman NR** (2015) The importance of being absent: Auxin minima are required for axillary meristem formation. *Plant Cell* 26: 1836.
- Hofhuis H, Laskowski M, Du Y, Prasad K, Grigg S, Pinon V, Scheres B** (2013) Phyllotaxis and rhizotaxis in *Arabidopsis* are modified by three PLETHORA transcription factors. *Curr Biol* 23: 956-962.
- Hove CA, Heidstra R** (2008) Who gets whom? Plant cell fate determination by asymmetric cell division. *Curr Opin Plant Biol* 11: 34-41.
- Leibfried A, To JPC, Busch W, Stehling S, Kehle A, Demar M, Kieber JJ, Lohmann JU** (2005) WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature* 438: 1172-1175.
- Leiboff S, Li X, Hu HC, Todt N, Yang J, Li X, Yu X, Muehlbauer GJ, Timmermans MCP, Yu J, Schnable PS, Scanlon MJ** (2015) Genetic control of morphometric diversity in the maize shoot apical meristem. *Nature Commun* 6: 8974.
- Li P, Xue H** (2011) Structural characterization and expression pattern analysis of the rice *PLT* gene family. *Acta Biochim Biophys Sin* 43: 688-697.
- Long Y** (2015) Transcription factor movement and tissue patterning in *Arabidopsis* root meristem. Utrecht university repository (dissertation).
- Matsuzaki Y, Ogawa-Ohnishi M, Mori A, Matsubayashi Y** (2010) Secreted peptide signals required for maintenance of root stem cell niche in *Arabidopsis*. *Science* 329: 1065-1067.
- Mockaitis K, Estelle M** (2008) Auxin receptors and plant development: A new signaling paradigm. *Annu Rev Cell Dev* 24:55-80.
- Moubayidin L, Di Mambro R, Sozzani R, Pacifici E, Salvi E, Terpstra I, Bao D, van Dijken A, Dello-Ioio R, Perilli S, Ljung K, Benfey PN, Heidstra R, Constantino P, Sabatini S** (2013) Spatial coordination between stem cell activity and cell differentiation in the root meristem. *Dev Cell* 26: 405-415.
- Nakajima K, Sena G, Nawy T, Benfey PN** (2001) Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* 413: 307-311.
- Ni J, Shen Y, Zhang Y, Wu P** (2014) Definition and stabilisation of quiescent centre in rice roots. *Plant Biol* 16: 1014-1019.
- Pallakies H, Simon R** (2014) The CLE40 and CRN/CLV2 signaling pathways antagonistically control root meristem growth in *Arabidopsis*. *Mol Plant* 7: 1619-1636.
- Perilli S, Di Mambro R, Sabatini S** (2012) Growth and development of root apical meristem. *Curr Opin Plant Biol* 15: 17-23.
- Polyn S, Willems A, De Veylder L** (2015) Cell cycle entry, maintenance, and exit during plant development. *Curr Opin Plant Biol* 23:1-7.
- Richards S, Wink RH, Simon R** (2015) Mathematical modeling of *WOX5*- and *CLE40*-mediated columella stem cell homeostasis in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 66: 5375-5384.
- Sabatini S, Heidstra R, Wildwater M, Scheres B** (2003) SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. *Genes Dev* 17: 354-358.
- Schaller GE, Street IH, Kieber JJ** (2014) Cytokinin and the cell cycle. *Curr Opin Plant Biol* 21: 7-15.
- Scheres B** (2007) Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 345-354.
- Schoof H, Lenhard M, Haecker A, Mayer KFX, Jürgens G, Laux T** (2000) The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell* 100: 635-644.
- Scofield S, Dewitte W, Nieuwland J, Murray JAH** (2013) The *Arabidopsis* homeobox gene *SHOOT MERISTEMLESS* has cellular and meristem-organisational roles with differential requirements for cytokinin and CYCD3 activity. *Plant J* 75: 53-66.
- Skylar A, Wu X** (2011) Regulation of meristem size by cytokinin signaling. *J Integr Plant Biol* 53: 446-454.
- Smith ZR, Long JA** (2010) Control of *Arabidopsis* apical-basal embryo polarity by antagonistic transcription factors. *Nature* 464: 423-426.
- Song XF, Yu DL, Xu TT, Ren SC, Guo P, Liu CM** (2012) Contributions of individual amino acid residues to the endogenous CLV3 function in shoot apical meristem maintenance in *Arabidopsis*. *Mol Plant* 5: 515-523.
- Sparks E, Wachsman G, Benfey PN** (2013) Spatiotemporal signalling in plant development. *Nat Rev Gen* 14: 631-644.
- Stahl Y, Grabowski S, Bleckmann A, Kühnemuth R, Weidtkamp-Peters S, Pinto KG, Kirschner GK, Schmid JB, Wink RH, Hülsewede A, Felekyan S, Seidel CAM, Simon R** (2013) Moderation

- of *Arabidopsis* root stemness by CLAVATA1 and ARABIDOPSIS CRINKLY4 receptor kinase complexes. *Curr Biol* 23: 362-371.
- Stahl Y, Simon R** (2010) Plant primary meristem: shared functions and regulatory mechanism. *Curr Opin Plant Biol* 13: 53-58.
- Stahl Y, Wink RH, Ingram GC, Simon R** (2009) A signaling module controlling the stem cell niche in *Arabidopsis* root meristems. *Curr Biol* 19: 909-914.
- Takatsuka H, Umeda M** (2013) Hormonal control of cell division and elongation along differentiation trajectories in roots. *J Exp Bot* 65: 2633-2643.
- Tucker MR, Laux T** (2007) Connecting the paths in plant stem cell regulation. *Trends Cell Biol* 17: 403-410.
- Ueda M, Matsui K, Ishiguro S, Sano R, Wada T, Paponov I, Palme K, Okada K** (2004) The *HALTED ROOT* gene encoding the 26S proteasome subunit RPT2a is essential for the maintenance of *Arabidopsis* meristems. *Development* 131: 2101-2111.
- van den Berg C, Willemsen V, Hendriks G, Weisbeek P, Scheres B** (1997) Short-range control of cell differentiation in *Arabidopsis thaliana* root meristem. *Nature* 390: 287-289.
- Weiss J, Alcantud-Rodriguez R, Toksöz T, Egea-Cortines M** (2016) Meristem maintenance, auxin, jasmonic and abscisic acid pathways as a mechanism for phenotypic plasticity in *Antirrhinum majus*. *Sci Rep* 6: 19807.
- Wong CE, Singh MB, Bhalla PL** (2013) Spatial expression of *CLAVATA3* in the shoot apical meristem suggest it is not a stem cell marker in soybean. *J Exp Bot* 64: 5641-5649.
- Wyrzykowska J, Schorderet M, Pien S, Gruissem W, Fleming AJ** (2006) Induction of differentiation in the shoot apical meristem by transient overexpression of a retinoblastoma-related protein. *Plant Physiol* 141: 1338-1348.
- Yadav RK, Perales M, Gruel J, Girke T, Jönsson H, Reddy GV** (2011) WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot apex. *Genes Dev* 25: 2025-2030.
- Yadav RK, Perales M, Gruel J, Ohno C, Heisler M, Girke T, Jönsson H, Reddy GV** (2013) Plant stem cell maintenance involves direct transcriptional repression of differentiation program. *Mol Syst Biol* 9: 654.
- Yanai O, Shani E, Dolezal K, Tarkowski P, Sablowski R, Sandberg G, Samach A, Ori N** (2005) *Arabidopsis* KNOX1 proteins activate cytokinin biosynthesis. *Curr Biol* 15: 1566-1571.
- Zhao Y** (2008) The role of local biosynthesis of auxin and cytokinin in plant development. *Curr Opin Plant Biol* 11: 16-22.
- Zhou C, Han L, Li G, Chai M, Fu C, Cheng X, Wen J, Tang Y, Wang ZY** (2014) STM/BP-LIKE KNOX1 is uncoupled from ARP in the regulation of compound leaf development in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 26: 1464-1479.

10.2. Addendum II.



La invasión del lirio acuático

24

ARTÍCULOS

Comunicación bajo tierra	16
La mitad oculta de las plantas	19
Sin raíz no hay maíz	22
¿Cómo sobrevivieron las aves a la extinción del cretácico?	28
CO ₂ y las aguas oceánicas: una relación tóxica	31
Pastos: importancia y diversidad	34
Reguladores de la presión arterial	37
De la endosimbiosis a las primeras plantas terrestres	41
Nutrición del adulto mayor con lesiones cerebrales	44

ARTÍCULO

De la endosimbiosis a las primeras plantas terrestres

Ernesto Vázquez Chimalhua

El modo de vida actual ha sido moldeado por la acción de las plantas desde hace miles de millones de años. Las plantas son organismos fotosintéticos capaces de capturar luz solar como fuente de energía y de fijar CO₂ (dióxido de carbono) atmosférico para aprovecharlo en su propio desarrollo, es decir, son autótrofos debido a que toman moléculas inorgánicas como alimento. Otro rasgo muy importante de las plantas es la cualidad de producir el oxígeno que respiramos.

Desde su origen, las plantas han sido los productores primarios y por lo tanto la base de la red alimenticia de los ecosistemas terrestres, dando sustento nutricional a los organismos heterótrofos (que se alimentan de moléculas orgánicas creadas por los organismos autótrofos) como los humanos. Hoy en día, también son la materia prima de varios artículos de uso cotidiano como papel, madera, resinas, algodón, medicinas, etc. Es importante mencionar que las plantas han sido parte trascendental del desarrollo de nuestras sociedades y culturas.

M.C. Ernesto Vázquez Chimalhua es estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas, opción Biología Experimental, adscrito al laboratorio de Ecología Microbiana del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
belengwer@yahoo.com



Las plantas y sus características de ancestros marinos

Las plantas evolucionaron a partir de microorganismos unicelulares simples nombrados procariontes, caracterizados por no tener un núcleo definido. Tales microorganismos procariontes eran marinos y formaban estructuras sedimentarias hechas de carbonato llamadas estromatolitos. En el suroeste de Groenlandia se ha encontrado el registro fósil más antiguo de estos organismos. El hallazgo corresponde al eón arcaico, que comprende de hace 4 mil a 2 mil quinientos millones de años (Ma) y se remonta a hace 3, 770 Ma, tan solo cerca de 700 Ma después de la formación de la tierra (hace 4, 500 Ma).

Se ha sugerido que, aquellos pioneros que proliferaron bajo la atmósfera reductora arcaica y colonizaron el planeta tierra, eran bacterias reductoras de sulfato y arqueas productoras de metano. Mientras transcurrían esos tiempos arcaicos, las bacterias evolucionaron a ser fotosintéticas, lograron absorber la luz para utilizarla como energía mediante la producción de pigmentos. En el presente, siguen existiendo bacterias fotosintéticas, un ejemplo es la bacteria verde sulfurosa (Chlorobia) que se ha encontrado en fumarolas a 2 mil quinientos metros de profundidad en el océano pacífico de México.

De las cianobacterias a los cloroplastos en plantas

Fue hace ~2, 600 Ma, que las cianobacterias aparecieron en la tierra a partir de la evolución de las bacterias fotosintéticas. Durante la evolución de las cianobacterias, la membrana plasmática en donde se realizaba la fotosíntesis se especializó invaginándose, de tal modo que se formaron las membranas tilacoides. La mayoría de las cianobac-

terias modernas contienen membranas tilacoides organizadas en capas internas paralelas alrededor de la membrana plasmática. Las cianobacterias se distinguieron porque producían oxígeno al realizar la fotosíntesis, incrementándose así la cantidad de oxígeno en la atmósfera terrestre al inicio del proterozoico, eón que comprende entre 2, 500 a 542 Ma. El incremento de oxígeno cambió el estado de la atmósfera de reducido a oxidado, eliminó el efecto invernadero termal provocado por el gas metano y propició los prerequisites atmosféricos para la vida aeróbica como la conocemos ahora. Actualmente, es bien sabido que las cianobacterias evolucionaron a los cloroplastos utilizados para la fotosíntesis por las plantas terrestres.

La teoría endosimbiótica sobre el origen de los eucariontes explica la evolución de los protistas

La teoría endosimbiótica propuesta inicialmente por el ruso Constantin Mereschkowsky en 1905, fue retomada para explicar el origen de las células eucarióticas en 1967 por Lynn Margulis. La teoría endosimbiótica propone que la mitocondria y los plástidos fotosintéticos de una célula eucariótica son el resultado de la evolución de antiguas simbiosis con organismos de vida libre. Se considera que alrededor de hace 1, 900 Ma las arqueas evolucionaron a células eucariotas, caracterizadas por tener compartimientos internos que conforman el núcleo y la mitocondria.

La hipótesis sobre el proceso de evolución de los eucariontes o eucariogénesis dice que, paralelamente se formaron el núcleo y la mitocondria. Se cree que, en los consorcios de microorganismo contenidos en los estromatolitos marinos, algunas arqueas engulleron a bacterias. De tal suerte

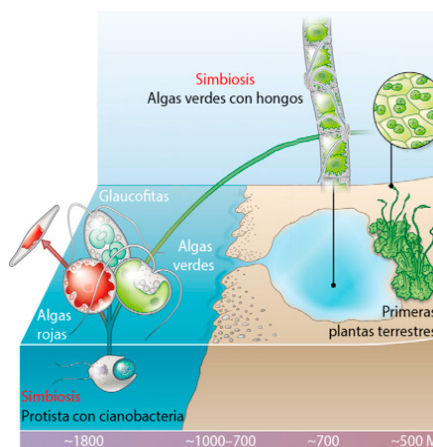
que, los productos de desperdicio metabólico de la bacteria engullida le servían como recursos energéticos a la arquea hospedera. Eventualmente, la bacteria engullida se convirtió en endosimbionte y finalmente originó la mitocondria.

De forma sincronizada al establecimiento de la mitocondria, la transferencia de genes entre la bacteria endosimbionte y la arquea hospedera ayudó a la creación del núcleo celular, definido por una envoltura membranosa. En el núcleo celular se localizó el ADN (ácido desoxirribonucleico) quimérico de ambos organismos interactuantes. Los descendientes de estas quimeras crearon organismos unicelulares eucariontes a los se les llamó protistas y, en los cuales evolucionó la división celular mitótica y luego meiótica.

El proceso de endosimbiosis dirigió la evolución de las algas y la transición del ambiente marino al terrestre por parte de las plantas.

Entretanto avanzaba el proterozoico, en el mar algunas cianobacterias que fueron fagocitadas por protistas, co-evolucionaron convirtiéndose en endosimbiontes. Las cianobacterias endosimbiontías dieron paso a la creación de los plastidios (orgánulos utilizados para llevar a cabo la fotosíntesis) dentro de los protistas, convirtiéndolos en algas.

A partir de un único evento simbiótico se desarrolló el ancestro común que dio origen a las algas verdes, rojas y glaucofitas. Se estima que las algas verdes se originaron hace ~1, 800 Ma, compatiblemente los restos de una alga roja primigenia fueron hallados en tapetes microbianos fosilizados que datan desde hace 1, 600 Ma. La adaptación a vivir en aguas dulces como lagos y ríos por parte de las algas verdes les otorgó una gran ventaja para



migrar al ambiente terrestre. Se ha postulado que durante el periodo Ordovícico, de ~485 a 443 Ma, las algas verdes colonizaron la superficie terrestre para generar los ancestros de las primeras plantas terrestres.

Ahora, se sabe que las algas verdes y las plantas terrestres más primitivas, las briofitas, están muy relacionados genéticamente. El microfósil más antiguo de la primera planta terrestre es de hace ~480 Ma, se trata de esporas con características

parecidas a las esporas de las briofitas hepáticas modernas. Para lograr establecerse en la tierra, las primeras plantas tuvieron que solucionar muchas adversidades, entre las cuales estaba la adquisición de minerales. Se ha argüido que la simbiosis con algunos hongos micorrícicos ayudó a las primeras plantas terrestres (tipo briofitas) a adquirir los minerales de la tierra. Esporas fosilizadas de hongos micorrícicos de 450 Ma de antigüedad evidencian su presencia en aquellos tiempos. Incluso, existe evidencia fósil precámbrica (de hace 551 a 635 Ma) de que antes de adaptarse a la tierra, las algas lograron hacer simbiosis con las hifas de hongos en el ambiente marino.

La asociación simbiótica de los hongos micorrícicos con las primeras plantas terrestres empezó con un intercambio de nutrientes. Los azúcares producidos por la fijación del CO₂ en las plantas eran cedidos a los hongos micorrícicos, a la vez, los nutrientes minerales del suelo que eran adquiridos por los hongos micorrícicos eran provisionados a las plantas hospederas.

La simbiosis de las plantas primitivas con los hongos micorrícicos permitió que las plantas ampliaran el área de captación de nutrientes, facilitando la terrestrialización de las plantas.



De Vries, J., Stanton A., Archibald J.M. y Gould S.B. (2016). *Streptophyte Terrestrialization in Light of Plastid Evolution. Trends in Plant Science.* 21:467-476.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pub-med/26895731>

Honrubia, M. (2009). *Las micorrizas: una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años. Anales del Jardín Botánico de Madrid.* 66:133-144.

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=55612935012>

Starr, C., Taggart R., Evers C. y Starr L. (2009). *Biología, la unidad y la diversidad de la vida.* Editorial Cengage Learning. 12a edición. 368-387 pp.
<http://www.revistaciencias.unam.mx/images/stories/Articles/73/CNS07302.pdf>

10.3. Addendum III.

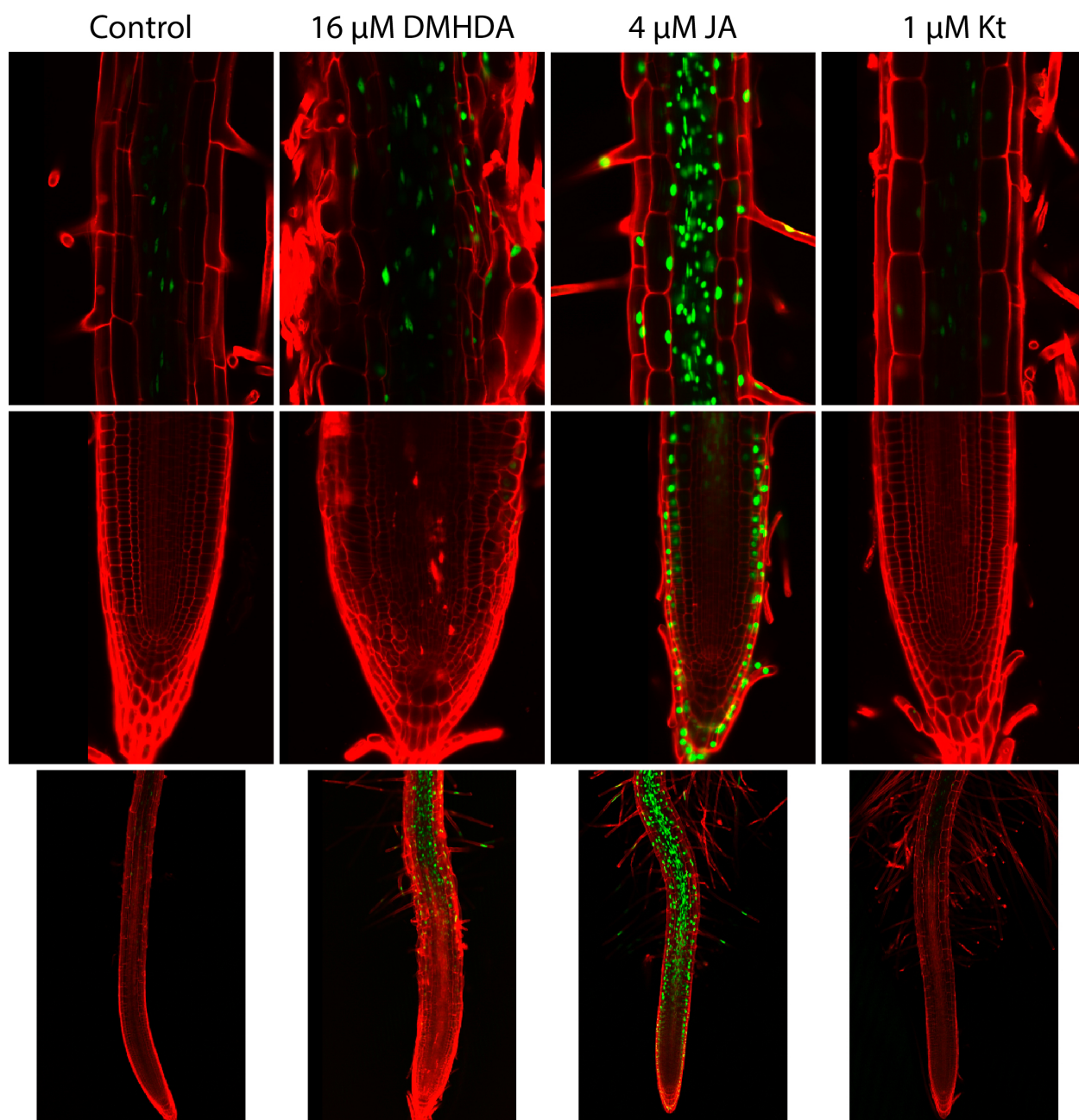


Figura adicional 1. La expresión del marcador de AJ *JAZ1::JAZ1:GFP* es activada por la DMHDA en la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

10.4. Addendum IV.

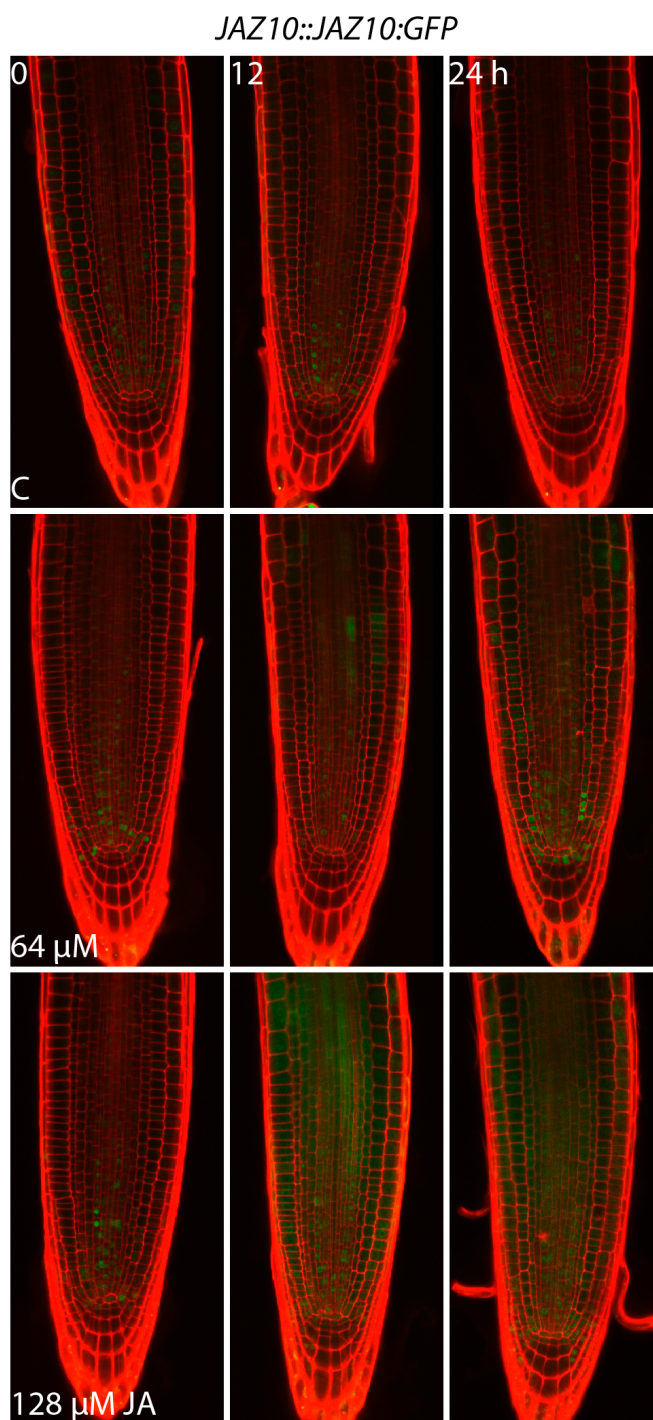


Figura adicional 2. Activación sistémica desde la parte aérea del marcador de AJ *JAZ10::JAZ10:GFP* en la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

10.5. Addendum V.

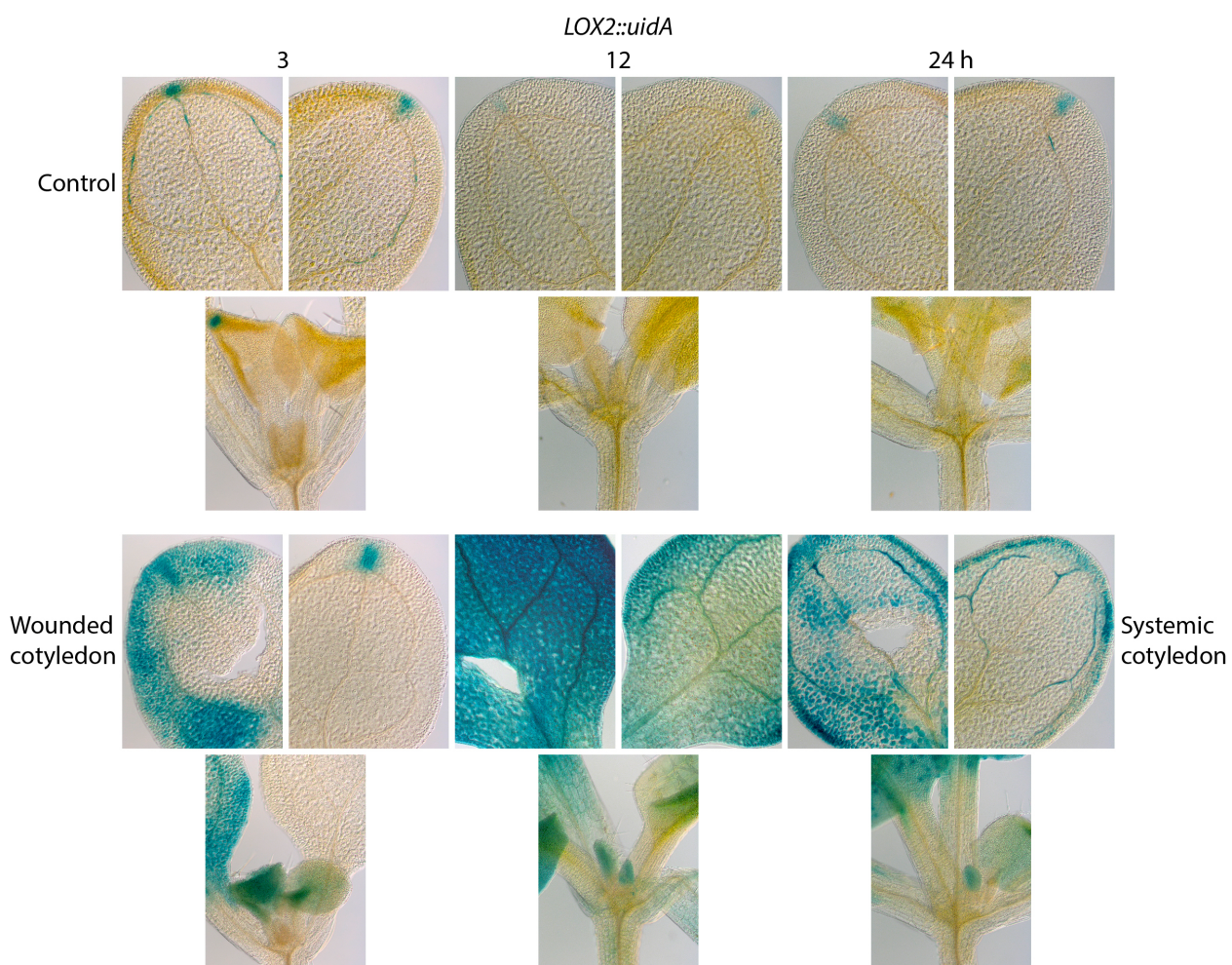


Figura adicional 3. Expresión sistémica del marcador de AJ *LOX2::uidA* en los cotiledones no heridos.

10.6. Addendum VI.

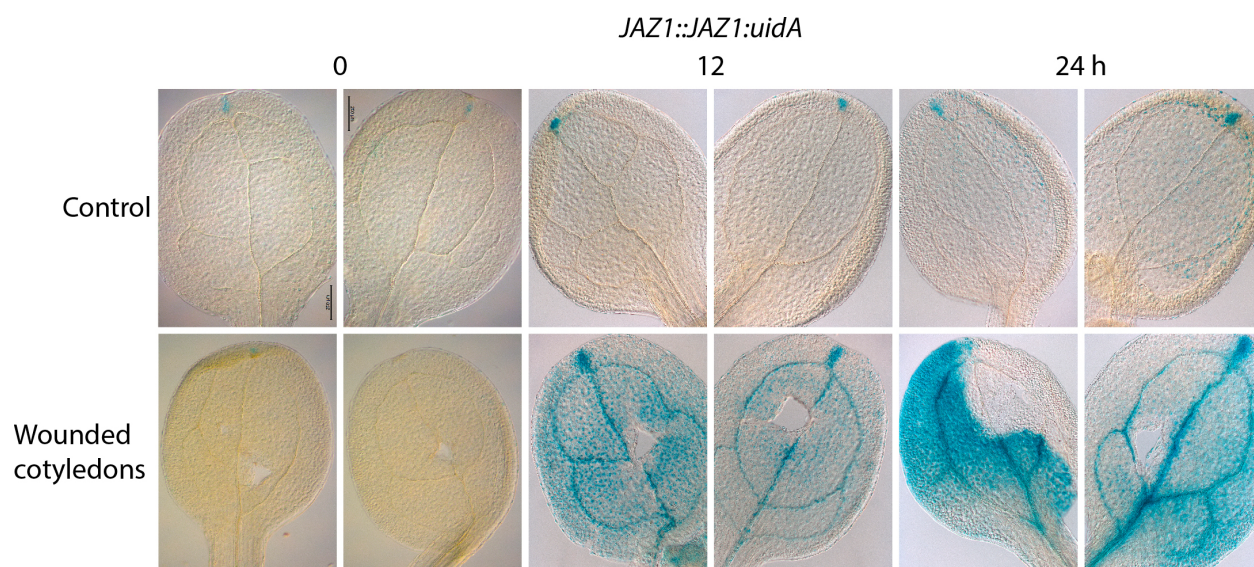


Figura adicional 4. Expresión del marcador de AJ *JAZ1::JAZ1:uidA* en respuesta a las heridas en los cotiledones.