



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS**



**“Identificación de rizobacterias promotoras del
crecimiento vegetal y su relación con la respuesta a
auxinas en *Arabidopsis*”**

Tesis que presenta:

BIÓL. ELIZABETH GARCÍA CÁRDENAS

Para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias en Biología Experimental

Asesor de Tesis:

D.C. José López Bucio

Co-Asesor:

D.C. Eduardo Valencia Cantero

Morelia, Michoacán, Agosto de 2017

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Biología
del Desarrollo Vegetal en el Instituto de
Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad
Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la
asesoría del D. C. José López Bucio y la co-asesoría
del D. C. Eduardo Valencia Cantero.

RECONOCIMIENTOS

Hago un especial agradecimiento al personal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, que hicieron posible la realización y culminación de este proyecto.

A mis asesores: El D.C. José López Bucio, por recibirme en su laboratorio de biología del desarrollo vegetal, dándome un espacio y la facilitación de toda herramienta y material de trabajo. Le agradezco profundamente por los apoyos económicos que me sustentaron al término de mi contrato como becaria CONACYT, gracias por sus enseñanzas que ampliaron mi conocimiento y por ser un excelente guía durante todo el proyecto de investigación.

A mi co-asesor el D.C. Eduardo Valencia Cantero, por su dedicación, las observaciones y contribuciones durante mi avance en el proyecto.

A mi comité tutorial: Los D.C. Ernesto García Pineda, Lourdes Macías Rodríguez y Elda Beltrán Peña, por su valiosa colaboración en la revisión exhaustiva de la redacción y el contenido de mi tesis, así como su contribución en los seminarios de evaluación dándome buenos consejos y observaciones.

Al M.C. Salvador Barrera, gracias por ser un elemento clave y dirigir en gran medida el proyecto, por guiarme con tus conocimientos y ser un gran amigo y compañero.

Al D.C. León Ruíz Herrera, D.C. Randy Ortiz Castro y la M.C. Viridiana Magaña Dueñas, por introducirme con sus enseñanzas al mundo de las plantas e interacciones con microorganismos y guiarme con su conocimiento en mis primeros pasos dentro de la investigación.

A CONACYT por su apoyo económico en la maestría como becario con número 330845.

AGRADECIMIENTOS

Un logro profesional no solamente se alcanza a base de estrategias metodológicas, el apoyo moral y afectivo fortalecen las relaciones humanas y nos impulsan a superar desafíos. Por ello, externo mi gratitud a quienes tuve la dicha de conocer y me apoyaron para concluir esta etapa.

A mis padres: Cecilia Cárdenas Valdovinos, por enseñarme el valor de la humildad y del trabajo, gracias madre por tu cariño y apoyo porque sin escatimar tus sacrificios me apoyas sobremanera. A mi padre Aurelio García Contreras, tu ingenio y conocimiento fueron tus mejores cualidades y lograron impulsar mi aprendizaje para ser como tú, espero no haberte defraudado, comparto contigo este avance aunque ya no estés en este mundo.

A mis hermanos: Sahara Paola, Alejandro, Miguel Ángel y Eduardo García quiero que sepan que los admiro mucho, gracias por enseñarme el valor de la disciplina y de la lucha constante, por su cariño y reforzar mis propósitos, son una bendición muy grande para mí, los quiero mucho.

A mi tío David García: que ha sido como un padre y ha puesto en mí su confianza, por educarme y financiar mi carrera para realizarme profesionalmente. Gracias por enseñarme que sin constancia no hay superación.

A toda mi familia: que a la distancia no dejan de animarme, siempre esperando lo mejor para mí, gracias por su apoyo moral, a todos ustedes hago este logro suyo.

A mi mejor amiga: Saraí Esparza Reynoso (Shari), te agradezco inmensamente por tus consideraciones, tu tiempo y aceptación, gracias por procurarme, cuidarme y quererme, por los días que pasamos riendo de todo y por los tiempos difíciles en que “ya no queremos nada” pero siempre nos animamos y nos levantamos por más. Eres muy especial para mí y ojalá el tiempo nos permita convivir y alocarnos

mucho más, me quedo con muy buenas experiencias. Te deseo lo mejor siempre, te quiero mucho.

A mis compañeros y amigos del área del desarrollo vegetal: Juan Ángel Ayala (Johnny), Saraí Esparza (Shari), Salvador Barrera (Chavacane), Guadalupe Salmerón (Minion), Aarón Giovanni (Gia), Edith Muñoz (Etilia), Amira Garnica (Amy), Bricia Ruíz (Bris), Marina López (La Marina), Viridiana Magaña (Villy), Alejandro Méndez (Alex), Melissa Mendoza (Meli), Pedro Huerta (Pedrini), Gustavo Ravelo (Gus), Kirán Jiménez (Kirán), León Ruíz (Nino), Carlos Prado (Carlitos-Carlitos). Gracias por ser mi complemento, tienen un significado muy especial pues los considero mi segunda familia, me llevo experiencias muy agradables de cada uno, los quiero mucho. Y a mis amigas de estancia con quien compartí gratos momentos, Jessica L. Coria y Fresia Mejía Prieto, gracias por su amistad durante el poco tiempo que se nos permitió.

Y a aquellos que han trascendido y fueron indispensables en el laboratorio como amigos y compañeros, Randy Ortiz, Javier Raya y Ramón Pelagio, gracias por sus consejos y su compañía que hicieron un ambiente más ameno el lugar de trabajo.

A mi generación de maestría: integrada por Dulce, Hugo, Christian, Said, Gustavo, Laura Nicolasa, Alondra, Vicente, Roxana, Rocío, Laura, Marco, Saraí, Sharel y Marisol, fueron un gran equipo y me alegra que se haya dado una buena interacción con todos como grupo y además logramos establecer lazos de amistad, les deseo a cada uno mucho éxito en su plan de vida.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	6
2.1. Arquitectura de <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
2.2. La rizósfera: Un entorno dinámico con actividad metabólica y microbiológica	6
2.3. Moléculas de señalización en la comunicación planta-microorganismo	9
2.3.1. Auxinas	9
2.3.1.1. Homeostasis de auxinas: Biosíntesis, conjugación y degradación	10
2.3.1.2. Vía de señalización auxínica.....	14
2.3.2. Compuestos orgánicos volátiles (VOC)	16
2.3.3. <i>N</i> -acil- <i>L</i> -homoserina lactonas (AHLs): compuestos microbianos en la comunicación con plantas	19
2.4. Alcamidas y NAEs	21
2.5. Caracterización de los mecanismos de fitoestimulación de PGPR y sus efectos en la interacción con plantas.....	22
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVOS.....	27
5.1. OBJETIVO GENERAL	27
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
6.1. Material biológico y condiciones de crecimiento	28
6.2. Cepas bacterianas.....	28
6.3. Sistema de co-inoculación planta-bacteria	29
6.4. Análisis de la arquitectura radicular y aérea de <i>A. thaliana</i>	29

6.5. Análisis de la actividad histoquímica de GUS.....	29
6.6. Análisis estadístico	30
7. RESULTADOS.....	31
7.1. Morfología colonial de las rizobacterias en medio Luria-Bertani.....	31
7.2. Caracterización del crecimiento de cepas rizosféricas en medio de Murashige y Skoog y/o extracto de levadura.....	33
7.3. La inoculación de <i>Rhizobium</i> LM 175 promueve el crecimiento vegetal...	34
7.4. El grupo de <i>Rhizobium</i> y <i>Sinorhizobium</i> promueve diferencialmente el crecimiento vegetal.....	37
7.5. Respuesta auxínica en plantas inoculadas con <i>Rhizobium</i> y <i>Sinorhizobium</i>	39
7.6. Efecto de actinobacterias sobre la arquitectura de la raíz de <i>Arabidopsis</i>	40
7.7. <i>Micrococcus luteus</i> induce la respuesta a auxinas en la raíz primaria	44
7.8. Cinética de crecimiento vegetal en respuesta a <i>Micrococcus luteus</i>	45
7.9. Cinética de respuesta auxínica en plantas inoculadas con <i>Micrococcus luteus</i>	48
7.10. El efecto promotor de <i>M. luteus</i> en plantas silvestres está relacionado con un mecanismo dependiente de auxinas.....	50
8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	52
9. LITERATURA CITADA	59
10. ADENDA	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diversidad de los reguladores del crecimiento y desarrollo vegetal.	4
Figura 2. Mecanismos de fito-estimulación por las rizobacterias.	8
Figura 3. Rutas de biosíntesis de las auxinas en plantas a partir del triptófano.	11
Figura 4. Efecto de la inoculación de <i>Azospirillum brasilense</i> y el gen <i>ipdC</i> en plantas de <i>Arabidopsis</i> y trigo sobre la arquitectura radicular.	13
Figura 5. Vía de señalización de las auxinas.	16
Figura 6. Diversidad en la función y estructura de compuestos orgánicos volátiles producidos por las plantas.	17
Figura 7. Morfología colonial de las rizobacterias.	32
Figura 8. Efecto de la inoculación de <i>Arabidopsis</i> con <i>Rhizobium</i> LM 175.	36
Figura 9. Efecto de la inoculación con las cepas de <i>Rhizobium</i> y <i>Sinorhizobium</i> sobre la arquitectura de la raíz de <i>Arabidopsis</i> .	38

Figura 10. Respuesta de plántulas transgénicas <i>DR5:uidA</i> en la interacción con cepas de <i>Rhizobium</i> y <i>Sinorhizobium</i> .	39
Figura 11. Efecto de la inoculación con actinobacterias sobre la arquitectura de la raíz de <i>Arabidopsis</i> .	41
Figura 12. Efecto de la inoculación de actinobacterias en el follaje y peso fresco de <i>Arabidopsis</i> .	43
Figura 13. Efecto de la inoculación de actinobacterias sobre la longitud de los pelos radiculares.	44
Figura 14. Expresión de <i>DR5:uidA</i> en la punta de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> inoculada con las actinobacterias.	45
Figura 15. Cinética del desarrollo radicular de <i>Arabidopsis</i> en la interacción con <i>M. luteus</i> .	47
Figura 16. Cinética de la expresión de <i>DR5:uidA</i> correspondiente en la interacción de <i>Arabidopsis</i> con <i>M. luteus</i> .	49
Figura 17. Efecto de las plántulas silvestres y mutantes en elementos de la vía auxínica a la inoculación con <i>M. luteus</i> .	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades morfológicas de aislados bacterianos rizosféricos.	31
Tabla 2. Crecimiento de rizobacterias en distintas condiciones de cultivo para evaluar las interacciones con <i>Arabidopsis</i> .	34

RESUMEN

Las plantas tienen una gran capacidad para responder a estímulos externos debido a que poseen plasticidad fenotípica, permitiendo modificar su arquitectura en respuesta a condiciones ambientales cambiantes. Las auxinas son reguladores del crecimiento vegetal que controlan la mayoría de eventos de morfogénesis durante el ciclo de vida y actúan como moléculas de señalización en las interacciones planta-microorganismo. La auxina natural más abundante es el ácido indol-3-acético (AIA) y su actividad está controlada a través de su metabolismo, transporte y percepción por una familia de receptores proteínicos.

En este trabajo se evaluaron las propiedades del crecimiento vegetal por varios aislados bacterianos provenientes de diferentes rizósferas y su efecto en el crecimiento y la respuesta a auxinas en *Arabidopsis thaliana*. Se caracterizaron 13 cepas a partir de una colección de 1500 aislados, con base en su efecto fito-estimulante. El análisis de las secuencias de los RNA ribosomales 16S indica que nueve aislados corresponden al género *Bacillus*, un aislado se tipificó como *Rhizobium* y tres pertenecen al grupo de las actinobacterias, incluyendo *Micrococcus luteus*, *Cellulomonas* sp., y *Kocuria* sp. Durante los primeros días en interacción con *Arabidopsis*, *M. luteus* activó la expresión del gen inducible por auxinas *DR5:uidA*, disminuyó la longitud de la raíz primaria, e incrementó la formación de raíces laterales y pelos radiculares. En respuesta a *Kocuria* sp. el incremento de biomasa no correlaciona con la inducción de la respuesta auxínica, lo que sugiere diversos mecanismos de estimulación del crecimiento vegetal por rizobacterias.

Palabras clave: *Arabidopsis*, actinobacterias, desarrollo de la raíz, auxinas, rizósfera.

ABSTRACT

Plants are capable to respond to external stimuli due to their great phenotypic plasticity, which allows them to modify their architecture in response to changing growth conditions. Auxins are important growth regulators, which control most developmental transitions during the life cycle and act as signaling molecules in plant-microbe interactions. Indole-3-acetic acid (IAA) is the most abundant natural auxin and its activity is tightly regulated through metabolism, transport and perception through a family of protein receptors.

In this work, we evaluated the plant growth promotion properties of rhizobacterial strains in interaction with *Arabidopsis thaliana*. 13 bacterial isolates were selected from 1500 strains based on their phytoestimulant effects. An analysis of 16S RNA sequences indicated that nine of them belong into the *Bacillus* genus, three strains corresponded to *Actinobacteria* including *Micrococcus luteus*, *Cellulomonas* sp., and *Kocuria* sp. and one was identified as *Rhizobium*. *M. luteus* induced *DR5:uidA* expression since the first day on interaction, which correlated with primary root growth inhibition, while promoting lateral root formation and root hair development. In contrast, *Kocuria* sp. promoted growth without inducing an auxin response, suggesting different mechanisms of phytoestimulation by rhizobacteria.

Key words: *Arabidopsis*, actinobacteria, root development, auxins, rhizosphere.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas han adoptado estrategias adaptativas a su entorno mediante la integración de señales que modulan su crecimiento y desarrollo, permitiéndoles modificar su fenotipo ante las fluctuaciones ambientales a las que están sujetas. Esta propiedad, denominada plasticidad fenotípica contribuye a que la planta optimice la adquisición de nutrientes y agua por el sistema radicular y la captación de luz por el sistema vegetativo (Vanneste y Friml, 2009).

Diversos reguladores del crecimiento coordinan los programas de organogénesis, entre ellos se encuentran las giberelinas, los brasinoesteroides, el ácido abscísico, las estrigolactonas, las citocininas y las auxinas, mientras que la defensa es activada por el etileno, el ácido salicílico y el ácido jasmónico (Fig. 1). El papel que desempeñan estas fitohormonas tiene gran relevancia desde la embriogénesis hasta la senescencia y las respuestas celulares están finamente reguladas a través de interacciones moleculares en las que participan diversas vías de transducción de señales, a través de eventos de biosíntesis, transporte y degradación (Saini *et al.*, 2013; Pacifici *et al.*, 2015).

Las auxinas modulan la embriogénesis, el mantenimiento del meristemo apical radicular (RAM) y del brote (SAM), la emergencia de las raíces laterales, el desarrollo de los tejidos vasculares, la formación de primordios de hojas y raíces y los tropismos, entre otros procesos (Taiz y Zeiger, 2002; Su y Zhang, 2011; Lavenus *et al.*, 2013; Kalve *et al.*, 2014). Además de las plantas, diversas especies de hongos y bacterias producen auxinas, las cuales pueden tener un impacto positivo regulando la morfogénesis, mejorando la defensa y el crecimiento vegetal cuando establecen interacciones con las raíces (Ortíz Castro *et al.*, 2009).

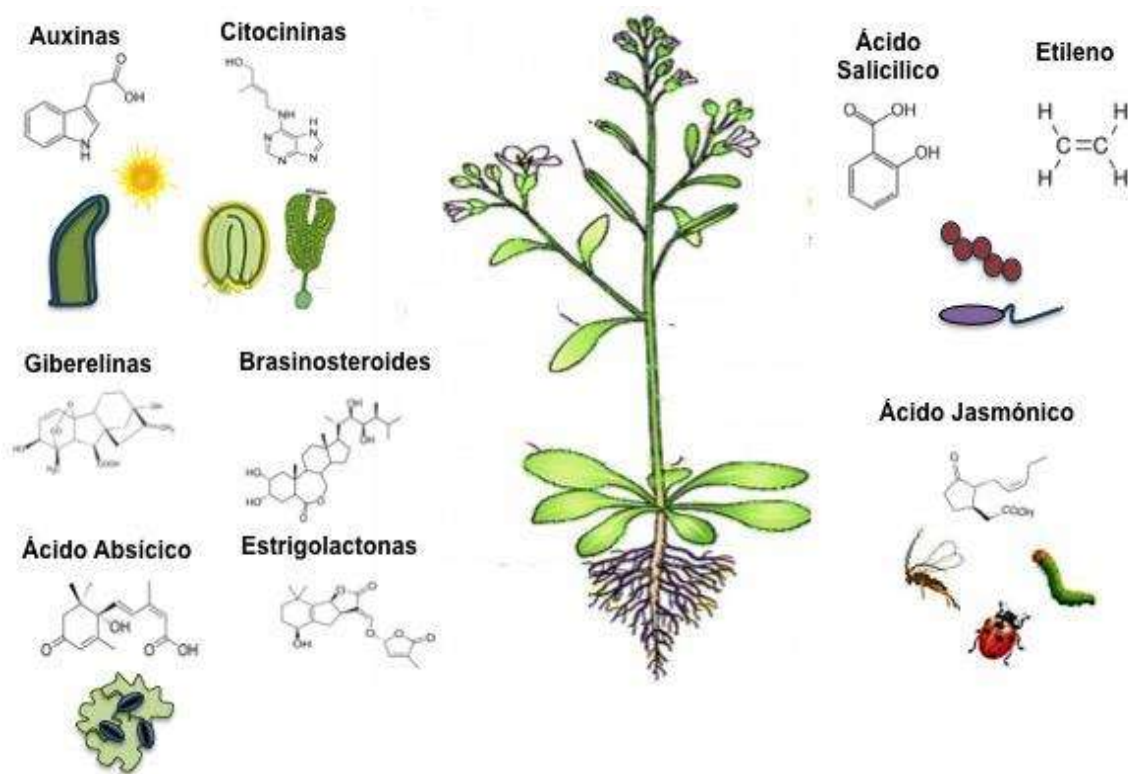


Figura 1. Diversidad de los reguladores del crecimiento y desarrollo vegetal.

Se presentan las estructuras químicas de las principales moléculas bioactivas en las plantas y las figuras de estructuras celulares y organismos ejemplifican los procesos en los que se han vinculado, a través de la activación y/o represión de rutas de transducción de señales.

A las comunidades bacterianas que promueven el crecimiento de las plantas se les ha denominado Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR), por sus siglas en inglés y comprenden gran diversidad de géneros como *Azospirillum*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Erwinia*, e incluyen tanto a especies de vida libre como formadoras de nódulos, por ejemplo *Rhizobium* (Gage, 2004). La aplicación de las PGPR como bioinoculantes o biofertilizantes constituye una herramienta biotecnológica promisorio para alcanzar un mayor rendimiento en los cultivos y así aminorar los impactos negativos de la aplicación excesiva de pesticidas o fertilizantes al ambiente (Liu *et al.*, 2014), por lo que es de nuestro interés comprender las interacciones planta-bacteria y caracterizar los

mecanismos de bioestimulación de algunas cepas rizosféricas seleccionadas en *Arabidopsis thaliana*.

2. ANTECEDENTES

2.1. Arquitectura de *Arabidopsis thaliana*

Existe gran diversidad de plantas que exhiben múltiples estrategias adaptativas, las cuales son moduladas por los reguladores del crecimiento y/o factores ambientales como la disponibilidad de agua, nutrientes y luz (López-Bucio *et al.*, 2003). En conjunto, estos estímulos regulan los programas de morfogénesis y desarrollo. *Arabidopsis thaliana* es el modelo por excelencia en angiospermas y su estructura vegetativa se compone de un tallo, flores, frutos y hojas que conforman el sistema aéreo, especializado en la reproducción y en la captura de luz para la fotosíntesis.

Por otra parte, el sistema radicular de *Arabidopsis* consta de una raíz primaria que se forma durante la embriogénesis, en cuyo ápice se localiza el meristemo, donde las células se dividen para posteriormente crecer y diferenciarse. La ramificación de la raíz ocurre por la formación de raíces laterales a partir de células del periciclo y los pelos radiculares se diferencian a partir de células de la epidermis (Tian *et al.*, 2014). Estas características hacen de la raíz un órgano altamente dinámico que permite el anclaje al suelo, participa en la captación de agua y nutrientes y en las interacciones planta-microorganismo (Hodge *et al.*, 2009).

2.2. La rizósfera: Un entorno dinámico con actividad metabólica y microbiológica

El sistema radicular influye sobre las poblaciones microbianas, particularmente abundantes en la región conocida como rizósfera, este término fue descrito primeramente por Hiltner (1904) como la porción del suelo que rodea a las raíces y que está habitada por poblaciones de microorganismos influenciados por los compuestos que producen las plantas (McNear, 2013). En la atracción y colonización de la raíz por diferentes especies bacterianas, tienen un papel

importante los exudados radiculares, que incluyen aminoácidos, ácidos grasos, esteroides, nucleótidos, ácidos orgánicos, azúcares y diversos compuestos con función nutritiva (Yadav *et al.*, 2015) (Fig. 2). Por otra parte, una gran variedad de bacterias se asocian e interactúan con la raíz y estimulan el crecimiento vegetal mediante diversos mecanismos directos que incluyen: la fijación de nitrógeno atmosférico por bacterias como las de vida libre (Bashan y de-Bashan, 2010), la formación de nódulos (Datta *et al.*, 2015; Rashid *et al.*, 2015), la producción de reguladores del crecimiento vegetal como auxinas (Ouzari *et al.*, 2008; Patil, 2011; Goswami *et al.*, 2014), citocininas (Ortíz-Castro *et al.*, 2008), y giberelinas (Gutiérrez-Mañero *et al.*, 2001), así como la actividad de la enzima ACC desaminasa (Bhusan *et al.*, 2013). Los mecanismos indirectos involucran la competencia con microorganismos fitopatógenos mediante la producción de antibióticos (Hamedi y Mohammadipanah, 2014), la producción de sideróforos (Wang *et al.*, 2014), de sustancias antimicrobianas (Whipps, 2001; Schwartz *et al.*, 2013; Chowdhury *et al.*, 2015) o la inducción de la resistencia sistémica en plantas (Annapurna *et al.*, 2013; Rangel de Souza *et al.*, 2015).

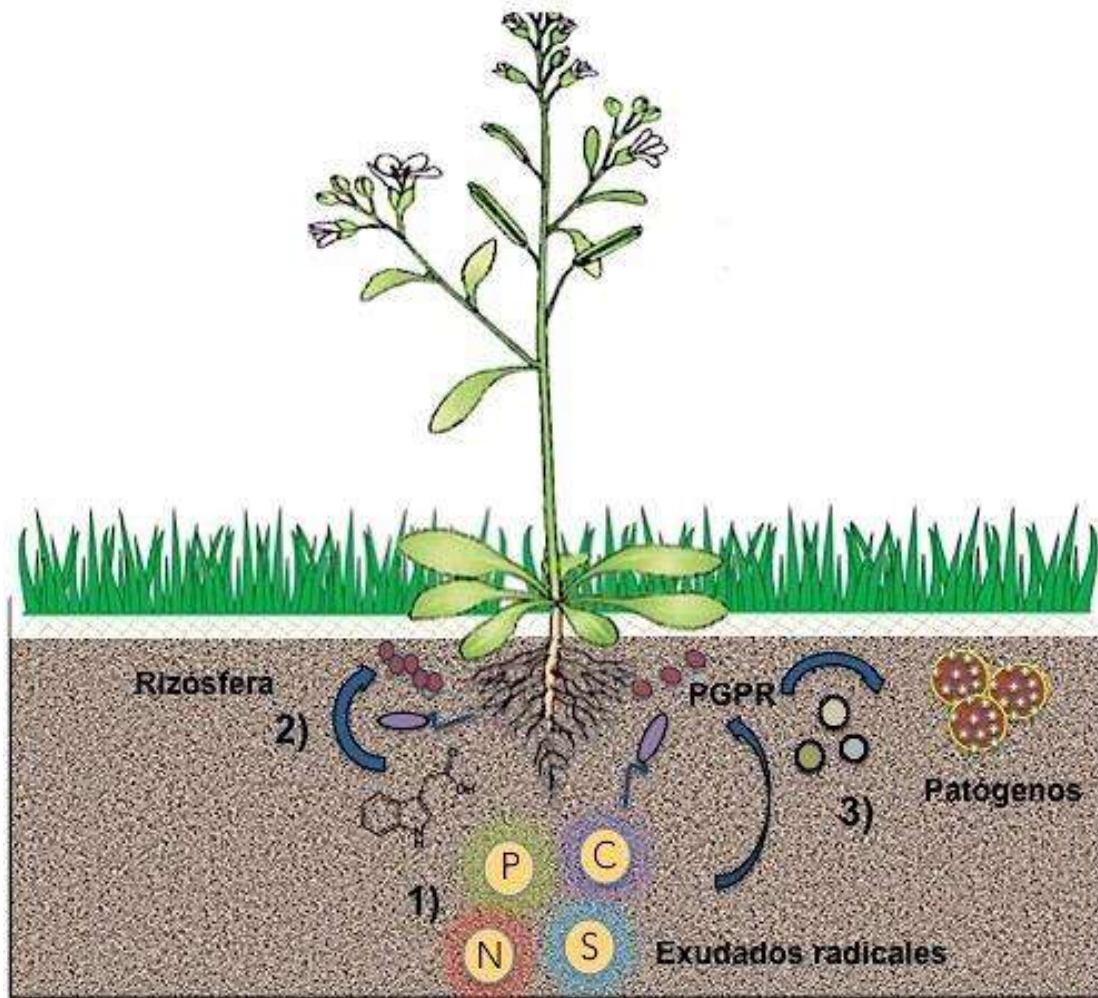


Figura 2. Mecanismos de fitoestimulación por las rizobacterias. 1). Las plantas producen exudados radicales con un aporte nutritivo para el microbioma. 2). Los microorganismos estimulan el crecimiento vegetal por la producción de fitohormonas por un mecanismo directo. 3). La producción de metabolitos secundarios, como los antibióticos por parte de los microorganismos inhibe el crecimiento de patógenos, el cual constituye un ejemplo de los mecanismos de fitoestimulación indirectos.

2.3. Moléculas de señalización en la comunicación planta-microorganismo

2.3.1. Auxinas

La síntesis de reguladores del crecimiento por los microorganismos constituye un mecanismo directo de fitoestimulación. Entre las fitohormonas que controlan el crecimiento y desarrollo destacan las auxinas, principalmente el ácido indol-3-acético (AIA). Recientemente, se propuso al calcio como mensajero celular, que podría estar participando en la modulación de la mayoría de los procesos fisiológicos que requieren respuestas rápidas por factores externos (Ljung, 2013; Vanneste y Friml, 2013). Aunque la producción de auxinas se ha descrito como el mecanismo principal de estimulación del crecimiento por bacterias del género *Azospirillum* (Somers *et al.*, 2005), existe escasa información de qué tan frecuente es la producción de estos reguladores por otras PGPR.

Además de la propiedad que tienen los microorganismos para producir auxinas, se ha documentado que también las utilizan como una molécula de señalización. El resultado del estudio con *Azospirillum*, un modelo caracterizado por la producción de ácido indol-3-acético, demuestra que las auxinas regulan la expresión de genes involucrados en la biosíntesis del AIA por la bacteria y en las plantas, el resultado de la inoculación de bacterias productoras de AIA mejoran el crecimiento a través de varios factores como la alteración de la morfología radicular, que incrementa el número de pelos radiculares y raíces laterales para facilitar la adquisición de agua y nutrientes. Esta observación es apoyada por estudios que utilizaron bacterias deficientes en la producción de auxinas, donde no se presenta la estimulación del desarrollo radicular que se observa en respuesta a la inoculación por la cepa silvestre. El AIA puede regular el comportamiento bacteriano, así como estimular la producción de antibióticos o de biopelículas como se observó en *P. syringae* pv *syringae*. Adicionalmente, en *Escherichia coli*, el AIA tiene un papel en la activación de genes de supervivencia bajo condiciones de estrés y rutas metabólicas, debido a que regula los niveles de expresión de genes involucrados

en los ciclos del ácido tricarboxílico, el glioxilato y la biosíntesis de aminoácidos (Spaepen *et al.*, 2007).

2.3.1.1. Homeostasis de auxinas: Biosíntesis, conjugación y degradación

Las auxinas son moléculas difusibles que se sintetizan en las zonas meristemáticas, las hojas jóvenes y en la raíz. La biosíntesis del AIA ocurre a partir del triptófano (TRP), a través de diversos intermediarios como: indol-3-acetamida (IAM), el ácido indol-3-pirúvico (IPA), indol-3-acetaldoxima (IAOx), y triptamina (TAM). La vía IPA involucra la remoción del grupo amino del triptófano y posteriormente una descarboxilación oxidativa, este último paso está mediado por la familia de flavin monooxigenasas YUCCA (YUC) para producir AIA (Korasick *et al.*, 2013; Panoli *et al.*, 2015). La vía TAM está presente tanto en monocotiledóneas como dicotiledóneas y es muy similar a la IPA, difiere en que los pasos en la conversión a AIA son inversos, primero ocurre una descarboxilación y después la desaminación. Interesantemente, el intermediario IAM se consideraba una vía única en bacterias hasta que se detectó ampliamente distribuida en plantas incluyendo en *Arabidopsis* y las enzimas que actúan en la conversión son la triptófano monooxigenasa y la hidrolasa indol-3-acetamida. Pocas son las especies de plantas que utilizan el intermediario IAOx, este se deriva del triptófano por la acción de los citocromos CYP79B2 y CYP79B3, posteriormente, el indol-3-acetonitrilo es sintetizado del IAOx y convertido a AIA por nitrilasas (Mano y Nemoto, 2011; Ljung, 2013) (Fig. 3). Se ha documentado que los microorganismos pueden utilizar algunas de estas vías para producir AIA, por ejemplo *Pseudomonas* y *Agrobacterium* utilizan al IAM para la producción de auxinas (Zhao, 2010; Dimpka *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015).

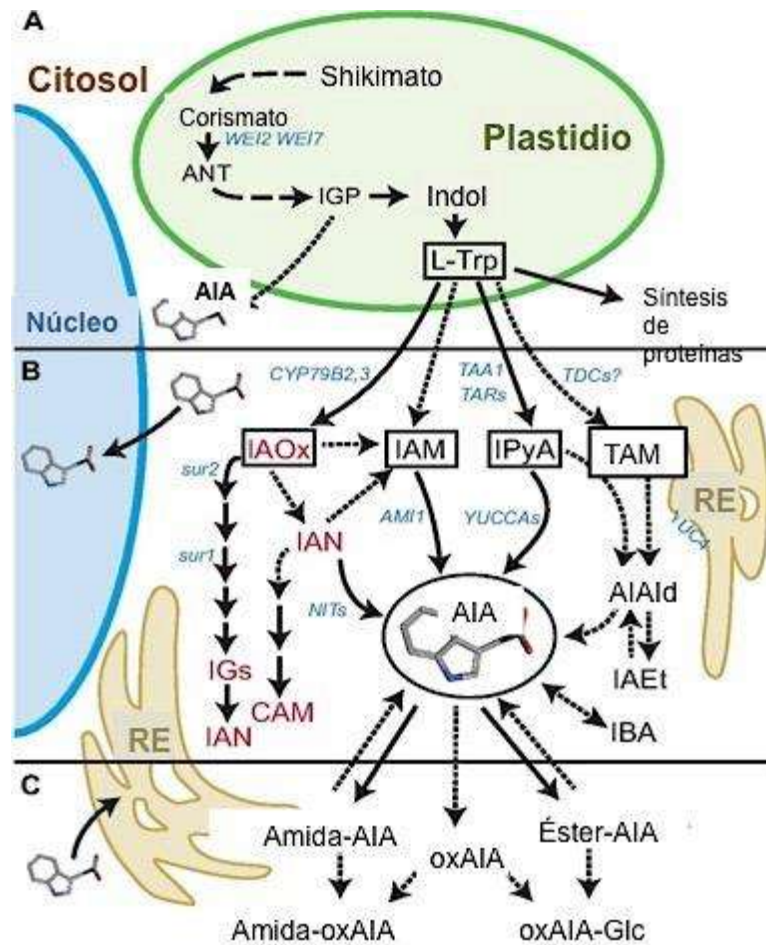


Figura 3. Rutas de biosíntesis de las auxinas en plantas a partir del triptófano. A). El triptófano se produce por la vía del shikimato, los intermediarios son el corismato y antranilato (ANT) para formar indol-3-glicerol fosfato (IGP) e indol. B). A partir del triptófano inician cuatro vías: IPA, IAM, IAOx y TAM con sus respectivas enzimas involucradas (azúl) en la conversión a ácido indol-3-acético (AIA), se sugiere que algunos intermediarios participan como precursores y productos de degradación de compuestos de defensa como indol, glucosinolatos (IG) y camalexina (CAM) C). Las auxinas se conjugan con aminoácidos, ésteres azúcares y para su degradación se inactivan por oxidación (oxAIA). Las flechas punteadas representan vías que no están bien definidas y las flechas sólidas las vías conocidas. Retículo endoplásmico (RE), ácido indol-3-butírico (IBA), indol-3-etanol (IAEt) (Modificado de Ljung, 2013).

En *Azospirillum*, la biosíntesis de AIA ocurre a través de IPA pero también puede utilizar el intermediario TAM. El gen *ipdC* (FAJ0009) codifica para la fenilpiruvato descarboxilasa, una enzima clave en la conversión de triptófano a AIA a través de IPA. La mutación de este gen produjo sobre la longitud de la raíz primaria, el número de raíces laterales y pelos radicales una respuesta igual a la de *Arabidopsis thaliana* tipo silvestre. En plantas de trigo, se observó una ligera reducción en el crecimiento de la raíz primaria con un efecto promotor en la formación de pelos radicales causada por la inoculación de la cepa silvestre dependiente de la concentración de inóculo, este efecto es más pronunciado en la construcción con el gen *ipdC* de la cepa silvestre que produce auxinas de manera constitutiva, demostrando así la importancia y la capacidad que tiene la producción de auxinas en la alteración de la arquitectura de las plantas por esta bacteria (Spaepen *et al.*, 2014) (Fig. 4).

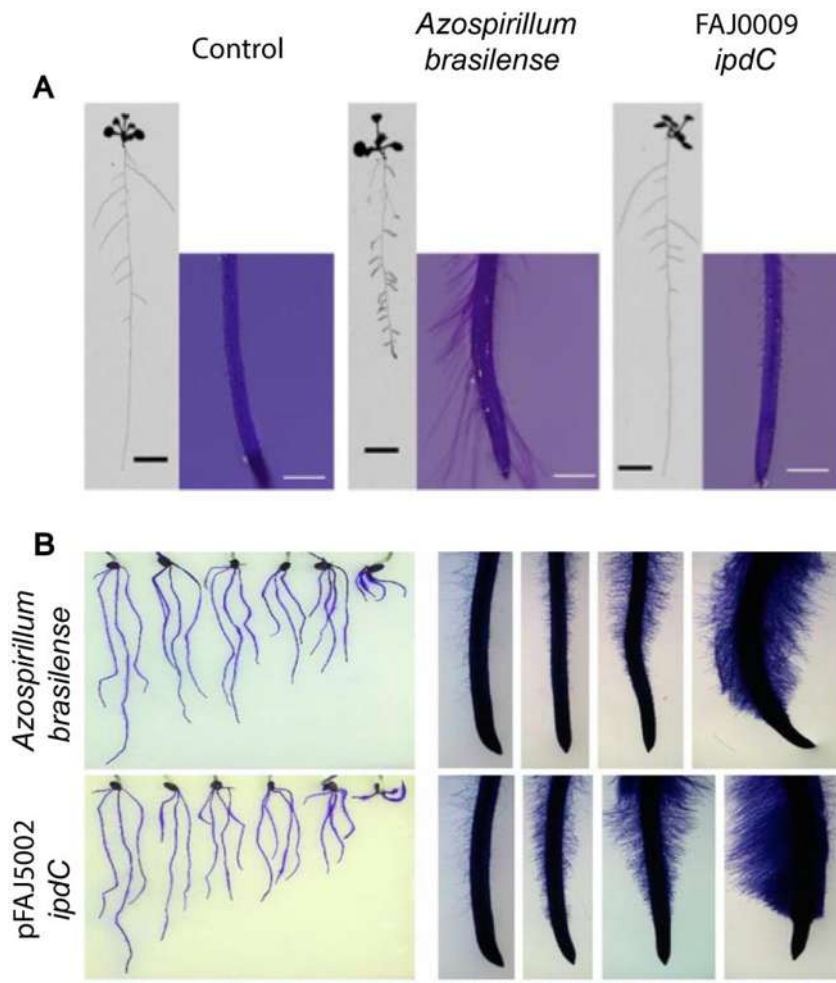


Figura 4. Efecto de la inoculación de *Azospirillum brasilense* y el gen *ipdC* en plantas de *Arabidopsis* y trigo sobre la arquitectura radicular. A). Respuesta fenotípica en la arquitectura y pelos radicales a la inoculación con 10^5 unidades formadoras de colonias (CFU) con la cepa silvestre y la mutante *ipdC* en la biosíntesis de auxinas en plántulas de 7 ddi. B). Plantas de trigo inoculadas en la raíz (panel izquierdo) a diferentes concentraciones de inóculo, de izquierda a derecha, no inoculadas y de ahí en adelante inoculadas con 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 CFU con la cepa silvestre y una sobreexpresora de auxinas (pFAJ5002). Además se observa el efecto sobre la formación de pelos radicales de izquierda a derecha, plantas no inoculadas, e inoculadas con 10^5 , 10^7 , 10^9 CFU de 7ddg. (Tomado de Spaepen, 2008 y Spaepen *et al.*, 2014).

Una manera de regular la disponibilidad de los niveles de auxinas en las plantas cuando no son requeridas es mediante su conjugación con otros compuestos, para su almacenamiento o degradación, esto debido a que altos niveles de auxinas tienen efectos inhibitorios sobre el crecimiento (Glick, 2014). Las moléculas conjugadas con auxinas se han clasificado en dos grupos: i) de bajo peso molecular, el AIA se conjuga con ésteres, azúcares (AIA-Glu), amidas o aminoácidos (AIA-Ala, AIA-Leu, AIA-Phe) y ii) de alto peso molecular, la conjugación ocurre con péptidos o proteínas (Korasick *et al.*, 2013). Se ha reportado que AIA-Ala, AIA-Leu y AIA-Fen pueden ser hidrolizados a AIA libre, mientras que la hormona conjugada con AIA-Asp se degrada (Ludwig-Müller, 2011). Las enzimas que catalizan la hidrólisis a las formas libres de auxinas son AIA-LEUCINE RESISTANT1 (ILR1), homólogos de ILR1 (ILL1 y 2), AIA-ALANINE RESISTANT3 (AIA-IAR3). La inactivación irreversible del AIA ocurre por oxidación para formar el ácido 2-oxoindol-3-acético (oxAIA) (Westfall *et al.*, 2010; Kramer y Ackelsberg, 2015).

2.3.1.2. Vía de señalización auxínica

La percepción de las auxinas inicia con su unión al receptor nuclear TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1), formando un co-receptor ensamblado con proteínas represoras Aux/IAA (TIR1/AFB-Aux/IAA), asociado a un complejo SKP1-Cul1-F-Box de tipo E3 ligasa ($SCF^{TIR1/AFB}$), donde las auxinas actúan como un “pegamento molecular” para promover la degradación del represor por interacción directa (Calderón *et al.*, 2012).

Cuando los niveles de auxinas son bajos, las proteínas represoras Aux/IAA forman multímeros con factores de respuesta a auxinas (ARFs) a través del dominio DIII/IV, bloqueando la transcripción de genes de respuesta a auxinas. Estos multímeros se asocian a un co-represor llamado TOPLESS (TPL) el cual recluta desacetilasas del nucleosoma (HDACs) (Causier *et al.*, 2012). Al aumentar la concentración de auxinas se promueve la ubiquitinación del represor Aux/IAA y su

degradación por el proteosoma 26S, dejando los ARF libres, lo que permite su unión a elementos de respuesta a auxinas (AuxREs) localizados en el promotor de los genes de respuesta a auxinas de las familias *GRETCHEN HAGEN (GH3)*, *SMALL AUXIN UPREGULATED (SAUR)* y *Aux/IAA* (Tian *et al.*, 2002).

Los componentes en la señalización de auxinas también pueden presentar modificaciones post-traduccionales. La nitración de TIR1 incrementa la degradación de factores Aux/IAA, por otra parte, los ARF pueden ser fosforilados por BIN2 (BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2), lo que suprime la interacción con los factores Aux/IAA, e induce la transcripción de genes de respuesta a auxinas (Fig. 5) (Wang y Estelle, 2014).

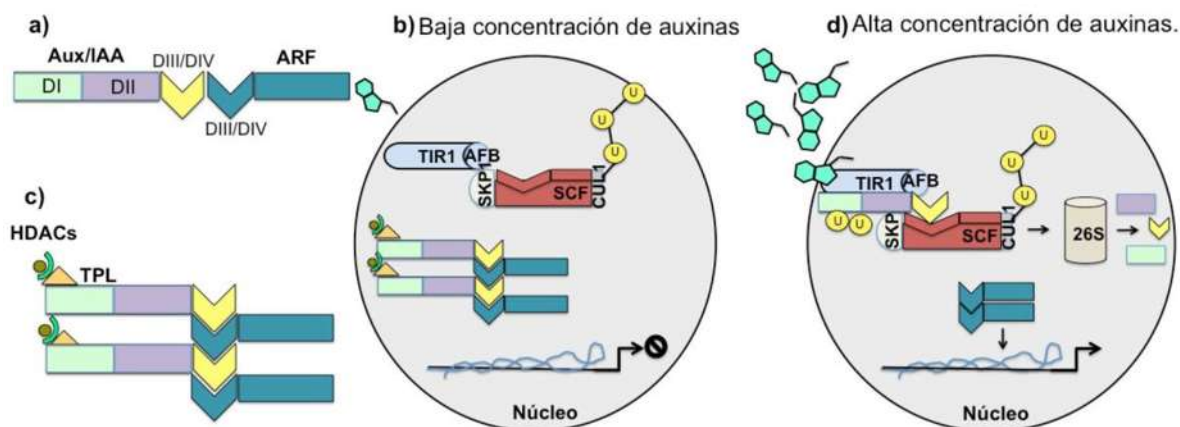


Figura 5. Vía de señalización de las auxinas. A). El represor Aux/IAA y el activador ARF interactúan por el dominio DIII/DIV. B). En baja concentración de auxinas no hay percepción por el co-receptor nuclear SCF^{TIR1/AFB} y el represor se encuentra formando multímeros con el activador, los cuales reclutan un complejo co-represor constituido por desacetilasas de histonas (HDAC's) y TOPLESS (TPL) en el dominio I y resulta en la represión de la transcripción de genes de respuesta a auxinas (C). D). En alta concentración de auxinas estas son percibidas por el complejo co-receptor permitiendo la ubiquitinación de Aux/IAA y su degradación en el proteosoma a través de SCF^{TIR1/AFB} quedando el activador libre para unirse a AuxRE en forma de dímeros permitiendo la transcripción de genes de respuesta a auxinas.

2.3.2. Compuestos orgánicos volátiles (VOC)

Los volátiles de bacterias actúan como moléculas de señalización en la fisiología de las plantas modulando el desarrollo de la parte aérea y radicular o activando la defensa a través de las vías del ácido salicílico (AS), etileno (ET) y ácido jasmónico (AJ) (Song y Ryu, 2013). En general, los VOC que son de origen vegetal se producen principalmente por tres rutas: i) la vía de ácidos grasos/lipooxigenasa (LOX), ii) del mevalonato y la deoxi-xilulosa-4-fosfato (DOXP), para originar terpenos y iii) la del ácido shikímico donde se produce el ácido salicílico a partir del ácido corísmico (Marín-Loaiza y Céspedes, 2007).

Mediante la emisión de VOC, las plantas pueden atraer polinizadores, dispersores de semillas o defenderse y protegerse contra herbívoros o microorganismos patógenos, entre otros (Fig. 6) (Marín-Loaiza y Céspedes, 2007; Dudareva *et al.*, 2013).

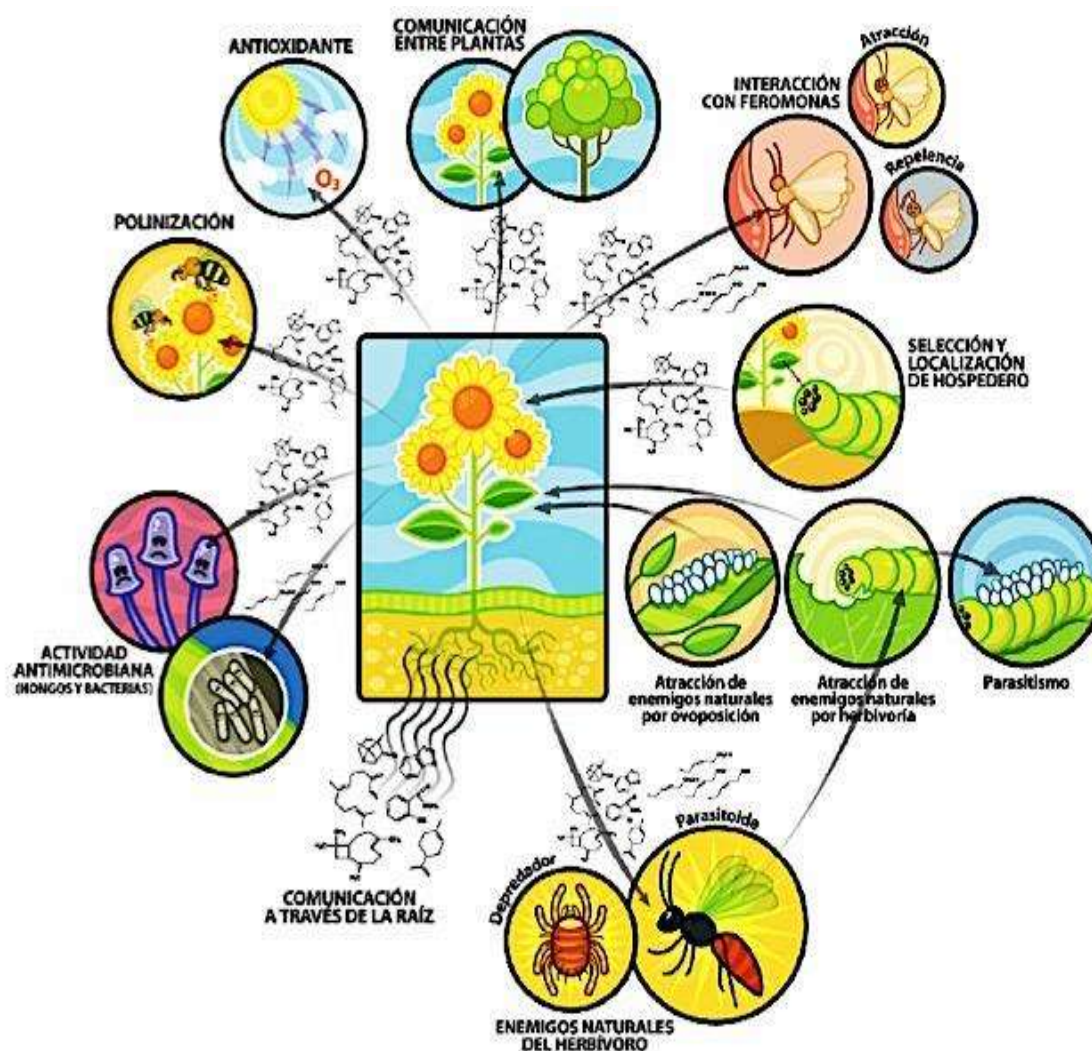


Figura 6. Diversidad en la función y estructura de compuestos orgánicos volátiles producidos por las plantas. Se ejemplifican las interacciones ecológicas reportadas y posibles funciones de algunas moléculas (Tomado de Marín-Loaiza y Céspedes, 2007).

Tanto los patógenos como las plantas han desarrollado sofisticados mecanismos de ataque y defensa, respectivamente. La primera línea de defensa en plantas se activa por el reconocimiento de las moléculas asociadas a patógenos (PAMP's) que estimulan la inmunidad. Aunque los patógenos pueden tener la capacidad de secretar factores de virulencia, las plantas pueden reconocer estos efectores y activar una segunda etapa de defensa llamada inmunidad contra efectores (ETI) y a su vez desencadenar la resistencia sistémica adquirida (SAR), que involucra al ácido salicílico como mensajero celular y la inducción de los genes relacionados a patogénesis (PR) (Walling, 2001).

Por otra parte, diversos microorganismos incrementan el crecimiento en la planta mediante la emisión de volátiles. Por ejemplo, Ryu y colaboradores (2003), demostraron que el 2-3 butanediol y la acetoina, producidos por *Bacillus subtilis* (GB03) y *Bacillus amyloliquefaciens* promueven el crecimiento de *Arabidopsis*, regulan la homeostasis de auxinas y favorecen la capacidad fotosintética al incrementar el contenido de clorofila. Adicionalmente, estos volátiles activan la resistencia sistémica inducida (ISR) que confiere protección al patógeno *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, disminuyendo la severidad de la enfermedad en plantas de *Arabidopsis* (Ryu et al., 2004).

2.3.3. N-acil-L-homoserina lactonas (AHLs): compuestos microbianos en la comunicación con plantas

Desde que se conocieron las formas de comunicación entre bacterias, éstas dejaron de considerarse como organismos simples. Las moléculas que fisiológicamente producen los procariotes actúan como señales químicas, denominadas autoinductores, que al alcanzar una concentración externa dependiente de la densidad poblacional, se difunden libremente a través de las membranas y sincronizan así la expresión génica y el comportamiento bacteriano, por lo que se les conoce como compuestos de quorum-sensing (Miller y Bassler, 2001). En este proceso las bacterias perciben la señal a través de la interacción con una proteína que actúa como regulador transcripcional y se activan los genes que participan en múltiples funciones, como la bioluminiscencia, virulencia, competencia, esporulación, producción de antibióticos, biosíntesis de exopolisacáridos, transferencia de plásmidos y movimiento bacteriano (Waters y Bassler, 2006). En las bacterias Gram negativas, se han descrito sistemas que utilizan AHLs como moléculas autoinductoras, que son producidas por la familia de sintasas LuxI y reguladas por la familia de factores transcripcionales LuxR (Waters y Bassler, 2005).

La estructura de las AHLs comprende un anillo homoserina lactona conservado que se une por un enlace tipo amida a una cadena (N)-acil de ácido graso que varía de 4 a 18 carbonos y en el grado de saturación. A pesar de que estas moléculas son exclusivas de las bacterias, se ha demostrado que al ser percibidas por las plantas pueden modular la arquitectura de la raíz (Von Rad *et al.*, 2008). En *Arabidopsis*, la percepción de AHLs modifica el crecimiento de la raíz primaria, mostrando una inhibición que va acompañada de una ramificación por la formación de raíces laterales y el desarrollo de pelos radiculares, y la respuesta de la planta varía dependiendo de la longitud de la cadena de ácido graso y la concentración de la molécula, siendo la AHL de 10 carbonos el compuesto más activo identificado a la fecha (Ortíz-Castro *et al.*, 2008).

El quórum sensing que regula la virulencia en *Pseudomonas* comprende dos sistemas: 1) *LasI*, que sintetiza la 3-oxo-C12 AHL y 2) *RhlI*, que produce la AHL de 4 carbonos. En un estudio del efecto de *Pseudomonas aeruginosa* sobre la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis in vitro* mediante un sistema de co-cultivo a distancia, se encontró un incremento de biomasa en la raíz y follaje en respuesta a la inoculación con la mutante simple *lasI*, que no sintetiza la 3-oxo-C12 AHL. Lo anterior pudo ser explicado por la sobreproducción de ciclodipeptidos: Ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Phe), y ciclo(L-Pro-L-Val) que activan la vía de señalización de auxinas debido a que estas moléculas pueden interactuar con el receptor de auxinas por unión directa activando la cascada de señalización auxínica (Ortíz-Castro *et al.*, 2011). Estos resultados indican que hay compuestos producidos por microorganismos que son capaces de ser reconocidos por las plantas y alteran el crecimiento a través de la vía auxínica. Adicionalmente, se ha atribuido la participación de AHLs en la inducción de resistencia a patógenos por *Sinorhizobium meliloti* en tres diferentes especies vegetales de interés económico como trigo (*Triticum aestivum*), cebada (*Hordeum vulgare*) con lo que se confirma una actividad dual para estas moléculas: regulando tanto el desarrollo como la defensa (Hernández-Reyes *et al.*, 2014).

Existe escasa información sobre la regulación del quórum sensing en el grupo de las Actinobacterias; de los 342 géneros que lo conforman, 25 se han reportado que tienen algún tipo de regulación por quórum, y 16 géneros presentan homólogos de *LuxR*, de acuerdo a un análisis bioinformático de secuencias genómicas (Santos *et al.*, 2012). Parte de la importancia de conocer los sistemas de quórum sensing es debido a que producen metabolitos secundarios y antibióticos, mayormente en especies de *Streptomyces* donde el quórum está regulado por un sistema de γ -butirolactonas (GBL), cuya estructura molecular y comportamiento es similar a AHLs (Du *et al.*, 2011). Además de las GBL, los metilenomicin furanos (MMFs) también han sido involucrados en la producción de antibióticos. El descubrimiento de otras moléculas, distintas de AHLs y GBL, como el factor PI (2,3-diamino-2,3-bis (hidroximetil 1,4-butanediol)), denota la

importancia de explorar este grupo biológico como fuente de metabolitos con efectos potenciales en las plantas (Polkade *et al.*, 2016).

2.4. Alcamidas y NAEs

Una clase novedosa de lípidos de señalización en plantas comprende a las alcamidas y *N*-aciletanolaminas (NAEs). Las primeras presentan actividad biológica de acuerdo a la longitud del ácido graso. En un reporte en *Arabidopsis* se comparó el efecto de tres alcamidas (*N*-isobutil-2E-6Z,8E-decatrienamida, *N*-isobutil-2E-decenamida y *N*-isobutil-decanamida) y se observó una mayor formación y emergencia de raíces laterales y un incremento en la elongación de pelos radiculares por las tres moléculas, aunque estas respuestas no estuvieron relacionadas a un posible efecto auxínico (Ramírez-Chávez *et al.*, 2004; López-Bucio *et al.*, 2006). En un estudio posterior, Méndez-Bravo *et al.*, 2011 reportaron que la *N*-isobutil-decanamida inhibió el crecimiento de la raíz primaria y estimuló la formación de raíces laterales de acuerdo a su concentración en el medio. Esta respuesta se correlacionó con un incremento en los niveles de óxido nítrico, la inducción de genes de respuesta al ácido salicílico y ácido jasmónico y también se observó una resistencia contra el patógeno necrotrófico *Botrytis cinerea*, particularmente en las hojas, indicando un papel de las alcamidas en la inducción de la inmunidad vegetal.

Recientemente el descubrimiento de una nueva alcamida, la dioxacmelamida aislada de la planta medicinal *Acmella ciliata* y cuya estructura presenta un peróxido cíclico, ha mostrado actividad *in vitro* contra de *P. falciparum* (Silveira *et al.*, 2016).

Las NAEs tienen un ácido graso unido por un enlace amida a una etanolamina que varían en el grado de saturación y número de carbonos de la cadena acilo. Estas moléculas son derivadas del fosfolípido *N*-acilfosfatidiletanolamina (NAPE), cuyo metabolismo es parte de la señalización por endocannabinoides en mamíferos (Ueda *et al.*, 2013). Las NAEs no están restringidas al grupo de las plantas, sino

que también regulan procesos fisiológicos en un amplio rango de organismos. Estas funciones se relacionan con el comportamiento, alimentación, miedo y ansiedad en mamíferos, como en el caso de la anandamida, uno de los endocannabinoides principales que tiene como blanco a receptores cannabinoides en el cerebro (Alger, 2004, Wang *et al.*, 2006).

En las plantas, las NAEs participan en la germinación de la semilla, encontrándose en alta concentración en las semillas desecadas y sus niveles disminuyen con la germinación (Blancaflor *et al.*, 2014). Se ha demostrado que estos eventos durante la transición de la semilla a la germinación están coordinados con la señalización del ácido abscísico (Teaster *et al.*, 2007). Una propuesta interesante es que las alcanidas y NAEs pudieran influir sobre el quórum-sensing en bacterias, ya que los compuestos producidos por microorganismos pueden modular la respuesta de defensa y desarrollo en las plantas, representando así señales de comunicación entre organismos de diferente reino (Ortíz-Castro, 2009).

2.5. Caracterización de los mecanismos de fitoestimulación de PGPR y sus efectos en la interacción con plantas

La relación entre las plantas y los microorganismos ha coexistido por millones de años y las estrategias mutualistas y de competencia han dado lugar a una vasta diversidad de mecanismos por los que ejercen una comunicación compleja que involucra la producción y liberación de reguladores del crecimiento vegetal, así como sustancias químicas que mejoran la defensa en las plantas, donde los exudados radiculares como intermediarios en esta comunicación tienen una participación destacable (Bais *et al.*, 2004). Estas comunidades microbianas residen en la rizósfera, dentro de las propiedades de bioestimulación ha ganado importancia el estudio de la producción de fitohormonas como las auxinas. Se estima que un 80% de los microorganismos, tanto hongos como bacterias producen AIA como producto final del metabolismo y a su vez repercute positivamente en el crecimiento vegetal, modificando los niveles endógenos de

auxinas de las plantas, como se ha descrito en varios géneros de PGPR (Spaepen *et al.*, 2007; Khamna *et al.*, 2010).

El estudio de estos mecanismos nos permite elucidar estrategias viables en el entendimiento de interacciones y su aplicación en la agricultura para contrarrestar los efectos negativos generados en el ambiente por contaminantes y atender la demanda de alimentos ante una población creciente, por ello, la caracterización de las interacciones microbianas con plantas adquiere más interés y nuevas especies bacterianas y sus propiedades siguen emergiendo (Farrar *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2017).

El género *Bacillus* comprende bacterias Gram positivas formadoras de esporas, de las que se han descrito varias especies con propiedades antifúngicas, en la inducción de la resistencia sistémica inducida (ISR), la síntesis de compuestos antimicrobianos, compuestos volátiles, fitohormonas, la producción de ácido-1-aminociclopropano-1-carboxílico desaminasa (ACC), también actúan sinérgicamente con microorganismos capaces de adquirir fósforo y fijadores de nitrógeno. Entre estas especies están *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* entre otras y recientemente *B. simplex* (Kumar *et al.*, 2011; Schwartz *et al.*, 2013; Chowdhury *et al.*, 2015).

B. simplex fue identificada mediante la secuenciación del gen que codifica el rRNA 16S y presentó actividad antifúngica contra el hongo *Fusarium* mejorando la biomasa y el crecimiento en co-cultivo con *Rhizobium*, lo que favoreció la nodulación de plantas de chícharo (*Pisum sativum*) (Schwartz *et al.*, 2013). En plantas de *Solanum tuberosum* se evaluaron parámetros de la raíz y del follaje, encontrando un incremento en el número y longitud de las raíces con la inoculación de *Bacillus* sp., una cepa productora de auxinas (Ahmed y Hasnain, 2010).

Además de los géneros de bacterias del grupo de las gram positivas anteriormente mencionadas, se han encontrado cepas novedosas que presentan más de un atributo con propiedades de bioestimulación. *Micrococcus* sp, una bacteria rizosférica, se caracterizó por ser productora de AIA, sideróforos, capaz de solubilizar fósforo y con actividad ACC desaminasa y en interacción con *Vigna unguiculata* mejoró la longitud de la raíz (Dastager *et al.*, 2010).

Dentro de la familia *Micrococcaceae* a la que pertenece *Micrococcus*, está también *Kocuria*, los miembros de este género incluyen 17 especies de las cuales varias de ellas son halotolerantes. *Kocuria turfanensis* es un ejemplo de una cepa halotolerante aislada de la rizósfera de *Suaeda fruticosa* de suelo salino que resiste 8% de NaCl suplementado en el medio. Las propiedades de bioestimulación de esta bacteria fueron evaluadas en plantas de *Arachis hypogaea* L, encontrando que produce AIA, sideróforos, amonio y solubiliza fosfato (Goswami *et al.*, 2014).

Las bacterias Gram positivas son muy abundantes en el suelo, representan el 30% de las comunidades microbianas y debido a la producción de metabolitos secundarios las hace buenas candidatas como herramientas biotecnológicas (Trujillo *et al.*, 2015). Estas han sido muy estudiadas en interacciones con plantas por su facilidad de estudio, así como manipulación de cultivo y genética (Francis *et al.*, 2010).

Ya sea de manera individual o en simbiosis, el impacto que tienen los microorganismos del suelo sobre el crecimiento de las plantas se ha documentado y aplicado a plantas de interés económico, beneficiando la productividad agrícola. *Rhizobium* es un ejemplo claro del efecto promotor en leguminosas y no leguminosas, implementándose como bioinoculante de manera comercial por su contribución de nitrógeno a las plantas cuando se asocia formando nódulos. Sus efectos promotores se han caracterizado de manera simple o en conjunto con *Azotobacter* y *Azospirillum* obteniendo resultados sinérgicos en el crecimiento de

las leguminosas tratadas (Parmar y Dufresne, 2011; Rashid *et al.*, 2015). Además de la fijación de nitrógeno, *Rhizobium* se caracteriza como productora de auxinas, las cuales están implicadas en la formación de nódulos, localizándose localmente en estas estructuras durante su desarrollo (Pii *et al.*, 2007).

Azotobacter pertenece al grupo de bacterias Gram negativas, caracterizada por producir ácido indol acético con y sin triptófano, observando que las bacterias producen más AIA con la suplementación del triptófano, sin embargo, en la concentración máxima de 5 mg/ml hay un efecto represor del crecimiento de la longitud de la raíz en las plantas tratadas, mientras que en concentraciones menores el efecto es promotor (Patil, 2011).

Ya que las auxinas constituyen un mecanismo de fitoestimulación importante, se han enfocado diversos estudios para entender su relevancia en la raíz, un órgano altamente dinámico con importancia nutricional y en el establecimiento de interacciones (Vacheron *et al.*, 2010). Por ello, este trabajo tiene como finalidad la identificación de cepas con propiedades bioestimulantes de una colección de aislados de rizósferas naturales en plántulas de *Arabidopsis* relacionadas con auxinas.

3. JUSTIFICACIÓN

Las auxinas son reguladores del crecimiento vegetal esenciales que coordinan diversos procesos fisiológicos durante el ciclo de vida de las plantas. Se ha demostrado que algunos microorganismos son capaces de producir auxinas o moléculas con actividad auxínica, las cuales modifican la arquitectura radicular y mejoran la captación de agua y nutrientes disponibles en el suelo. Sin embargo, hasta la fecha se desconoce qué tan común es esta propiedad en poblaciones rizosféricas naturales. Debido a ello es importante esclarecer el papel de la respuesta auxínica en los mecanismos de estimulación por rizobacterias.

4. HIPÓTESIS

Las propiedades de estimulación del crecimiento vegetal por diversas rizobacterias están relacionadas con la producción de auxinas o de compuestos que activan la respuesta auxínica en la planta.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las propiedades de bio-estimulación de una colección de rizobacterias aisladas de rizósferas naturales y la respuesta a auxinas en *Arabidopsis thaliana*.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar la morfología colonial de un grupo de aislados bacterianos provenientes de diferentes rizosferas.
2. Evaluar las propiedades de los aislados sobre la estimulación del crecimiento y el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.
3. Dilucidar la participación de la vía de señalización de las auxinas como parte del mecanismo de bioestimulación bacteriana.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material biológico y condiciones de crecimiento

Los experimentos se llevaron a cabo con semillas silvestres de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia-0 (Col-0), las líneas transgénicas *DR5:uidA* (Ulmasov *et al.*, 1997), *CycB1:uidA* (Colón-Carmona *et al.*, 1999), y las mutantes resistentes a auxinas *slr* (Fukaki *et al.*, 2001), *arf7/arf19* (Okushima *et al.*, 2007), *tir1* (Dharmasiri *et al.*, 2005), y *tir1/afb2/afb3* (Parry *et al.*, 2009). Las semillas fueron desinfectadas con etanol al 95% (v/v) durante 5 min seguido de hipoclorito de sodio al 20% (v/v) durante 7 minutos y 5 lavados con agua destilada estéril. Las semillas fueron incubadas 48 horas a 4 °C y posteriormente sembradas y crecidas en placas de Petri que contenían medio MS 0.2x (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con sacarosa al 0.6% y Phytagar al 1%, el pH se ajustó a 7. Las placas con las semillas se colocaron en una cámara de crecimiento (Percival Scientific AR-95L) en posición vertical a temperatura de 22 °C, con un fotoperiodo de 16 horas luz, 8 horas de oscuridad e intensidad de luz de 100 $\mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$.

6.2. Cepas bacterianas

En este proyecto se utilizaron cepas bacterianas aisladas de la localidad de Lometón en el municipio de Tarímbaro, Mich. a partir de rizósferas de maíz, limón y cepas no rizosféricas provenientes de suelo abierto. De 70 cepas caracterizadas como promotoras del crecimiento, se secuenciaron e identificaron 13 para evaluar los efectos en la planta (Ortíz Castro com. pers. 2015). Las bacterias fueron activadas en medio líquido Luria Bertani (LB) y crecidas en medio sólido a 28 °C por 24 horas antes de ser co-inoculadas con plántulas de *Arabidopsis thaliana*.

6.3. Sistema de co-inoculación planta-bacteria

En un sistema de contacto directo, plántulas de *Arabidopsis* de 4 ddg (días después de la germinación) fueron transferidas sobre un inóculo bacteriano que se colocó tomando una asada de cada bacteria en medio sólido MS 0.2x. Las placas se colocaron en una cámara de crecimiento a 22 °C y fueron distribuidas al azar por un periodo de tiempo de 6 a 8 ddi (días después de la interacción planta-microorganismo), cada experimento se realizó por triplicado, al final del cual se analizaron los parámetros de la arquitectura.

6.4. Análisis de la arquitectura radicular y aérea de *A. thaliana*

Al término del periodo de interacción, se midió la longitud de la raíz primaria con una regla y se cuantificó el número, densidad y longitud de raíces laterales con ayuda de un microscopio estereoscópico (Leica MZ6). Las imágenes de la expresión de los genes reporteros con la enzima β -glucuronidasa (GUS) (Leica DM500B) se observaron con los aumentos 10X y 40X. Los ensayos para cuantificar el peso fresco se realizaron con una balanza analítica (Ohaus, valor de precisión de 0.0001g) donde fueron colocadas las plantas, separando la raíz del follaje con un bisturí.

6.5. Análisis de la actividad histoquímica de GUS

Las plantas transgénicas con la construcción *DR5:uidA* y *CycB1:uidA* se colocaron en una placa de microtítulo con X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil, β -D glucurónido) como sustrato y se incubaron a 37 °C. Al final del tiempo de incubación, las plántulas se clarificaron con una solución de HCl 0.24 N y metanol 20% v/v por 60 min a 62 °C, después se colocaron en una segunda solución de NaOH 7% con etanol 60% v/v por 30 min a temperatura ambiente, se hicieron lavados con etanol al 40, 20 y 10 % v/v por 30 min cada uno (Malamy y Benfey, 1997) y se agregó

glicerol al 50% v/v. Al finalizar, las plántulas se fijaron en portaobjetos con glicerol para su análisis en un microscopio de campo claro con la óptica de Nomarski.

6.6. Análisis estadístico

Para detectar posibles diferencias significativas entre los tratamientos, se utilizó el programa StatSoft, Inc. (2004) y los datos se analizaron por univarianza con la prueba de post hoc Tukey, con diferencia significativa de ($p < 0.05$).

7. RESULTADOS

7.1. Morfología colonial de las rizobacterias en medio Luria-Bertani

Antes de evaluar el efecto de la interacción de cada cepa con la planta, se obtuvieron las características morfológicas al crecerlas en placa con medio LB, donde se muestra que cada aislado posee propiedades morfológicas distintas, los resultados se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Propiedades morfológicas de aislados bacterianos rizosféricos

Clave	Género	Morfología colonial				
		Color	Forma	Borde	Elevación	Superficie
LM 524	<i>Bacillus</i> sp	blanco	circular	entero	convexa	cremosa
LM 452 A	<i>Bacillus</i> sp	blanco	circular	entero	acuminada	rugosa
LM 112	<i>Bacillus</i> sp	amarillo	puntiforme	entero	plana	cremosa
LC 381	<i>Bacillus</i> sp	blanca	circular	entero	convexa	seca
LM 493	<i>Bacillus simplex</i>	beige	circular	entero	convexa	cremosa brillante
LM 453	<i>Bacillus simplex</i>	beige	circular	entero	convexa	cremosa brillante
LS 583	<i>Bacillus simplex</i>	beige	circular	entero	convexa	cremosa
LS 550 A	<i>Bacillus simplex</i>	beige	circular	entero	convexa	cremosa
LS 528	<i>Bacillus megaterium</i>	amarilla	puntiforme	entero	plana	lisa mate
LS 570	<i>Micrococcus luteus</i>	amarilla	puntiforme	entero	plana	cremosa
LM 510	<i>Cellulomonas</i> sp	amarilla	puntiforme	entero	elevada	cremosa
LC 390 B	<i>Kocuria</i> sp	blanca	irregular	ondulado	elevado	cremosa mate
LM 175	<i>Rhizobium</i> sp	beige	circular	entero	convexa	cremosa brillante

La figura 7 muestra fotografías representativas de las colonias, observándose características únicas entre los géneros, que se manifiestan por el color, la forma y la colonización en placa.

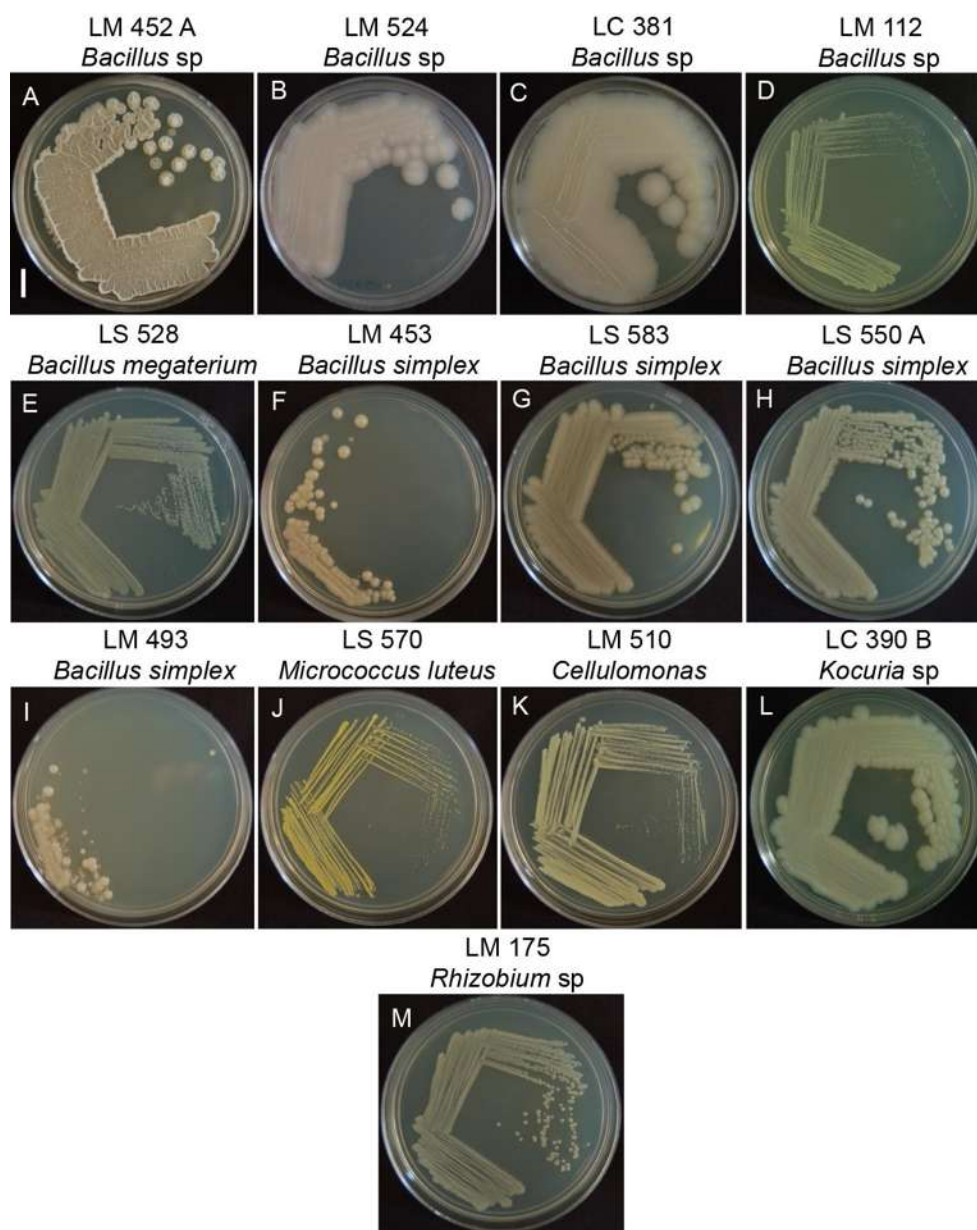


Figura 7. Morfología colonial de las rizobacterias. Se presentan placas representativas inoculadas con los diferentes aislados y el nombre de la especie de acuerdo al análisis de secuencia del ARN ribosomal 16S previamente realizado. Notar la diversidad de formas y colores de las colonias. A-E). Grupo de bacterias del género de *Bacillus*. F-I). Cepas de *Bacillus simplex*. J-L). Grupo de actinobacterias. M). Cepa de *Rhizobium*. Barra de escala 1 cm.

7.2. Caracterización del crecimiento de cepas rizosféricas en medio de Murashige y Skoog y/o extracto de levadura

Para evaluar las interacciones de los trece aislados bacterianos con plántulas de *Arabidopsis*, primero se caracterizó su crecimiento en medio MS 0.2x. Solo cuatro aislados tuvieron un crecimiento óptimo en dicho medio de cultivo. Debido a que el resto de las bacterias no creció en estas condiciones, se adicionó al medio antes mencionado extracto de levadura en concentraciones de 0.125, 0.25 y 0.5 g/L.

A partir de la concentración mínima de extracto de levadura, todas las cepas crecieron en forma dependiente de la concentración del extracto. Sin embargo, la adición del extracto de levadura estimuló la formación de raíces laterales y en las concentraciones de 0.25 y 0.5 g/L reprimió el crecimiento de la raíz primaria (datos no mostrados). Por el hecho que las plantas de *Arabidopsis* crecen adecuadamente en el medio MS 0.2x diseñado para su crecimiento óptimo, enfocamos la evaluación del efecto promotor de los aislados en esta condición. Observamos que los diferentes aislados promovieron el crecimiento diferencialmente, en este grupo se encontraron *Micrococcus luteus*, *Kocuria* sp. y una cepa de *Rhizobium*. Por el contrario, el aislado LM 452 A identificado como *Bacillus* sp., no obstante su alta capacidad de colonización, reprimió el crecimiento en contacto directo con las plantas (Tabla 2).

Tabla 2. Crecimiento de las rizobacterias en medio de cultivo MS 0.2x. El signo (-) corresponde a las cepas que no crecieron, (+) representa un crecimiento óptimo en el medio correspondiente sin la planta, sin embargo, el aislado LM 452 A tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento (datos no mostrados).

CEPA	MS (0.2x)	Ex lev 0.125 (g/L)	Ex lev 0.250 (g/L)	Ex lev 0.500 (g/L)
LM 524 <i>Bacillus</i> sp	(-)	(+)	(+)	(+)
LM 493 <i>Bacillus simplex</i>	(-)	(+)	(+)	(+)
LS 570 <i>Micrococcus luteus</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
LM 452 A <i>Bacillus</i> sp	(+)	(+)	(+)	(+)
LM 510 <i>Cellulomonas</i> sp	(-)	(+)	(+)	(+)
LM 453 <i>Bacillus simplex</i>	(-)	(+)	(+)	(+)
LS 528 <i>Bacillus megaterium</i>	(-)	(+)	(+)	(+)
LM 112 <i>Bacillus</i> sp	(-)	(+)	(+)	(+)
LC 390 B <i>Kocuria</i> sp	(+)	(+)	(+)	(+)
LC 381 <i>Bacillus</i> sp	(-)	(+)	(+)	(+)
LM 175 <i>Rhizobium</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
LS 583 <i>Bacillus simplex</i>	(-)	(+)	(+)	(+)
LS 550 A <i>Bacillus simplex</i>	(-)	(+)	(+)	(+)

7.3. La inoculación de *Rhizobium* LM 175 promueve el crecimiento vegetal

El primer paso para determinar las propiedades de estimulación del crecimiento vegetal fue investigar la capacidad de las cepas bacterianas para inducir cambios fenotípicos en *Arabidopsis* en co-cultivo por contacto directo. En los trece aislados se encontraron cepas que mostraron un efecto promotor sobresaliente. Una de ellas fue *Rhizobium* LM 175 aislada de rizósfera de maíz. Los ensayos de interacción planta-bacteria se realizaron transfiriendo plántulas de 4 ddg a placas

de Petri conteniendo medio MS 0.2x sobre un inóculo de la bacteria y a los 8 ddi se evaluó la arquitectura radicular. Las plantas sin inocular presentaron una longitud de la raíz primaria de 5 cm con un promedio de 10 raíces laterales, mientras que en las plántulas silvestres inoculadas con *Rhizobium* incrementó el número, densidad y longitud de raíces laterales sin modificar la longitud de la raíz primaria, en tanto que la parte aérea se estimuló el crecimiento en el tamaño del follaje. Interesantemente, esta bacteria colonizó completamente el sistema radical sin causar un efecto represor del crecimiento (Fig. 8).

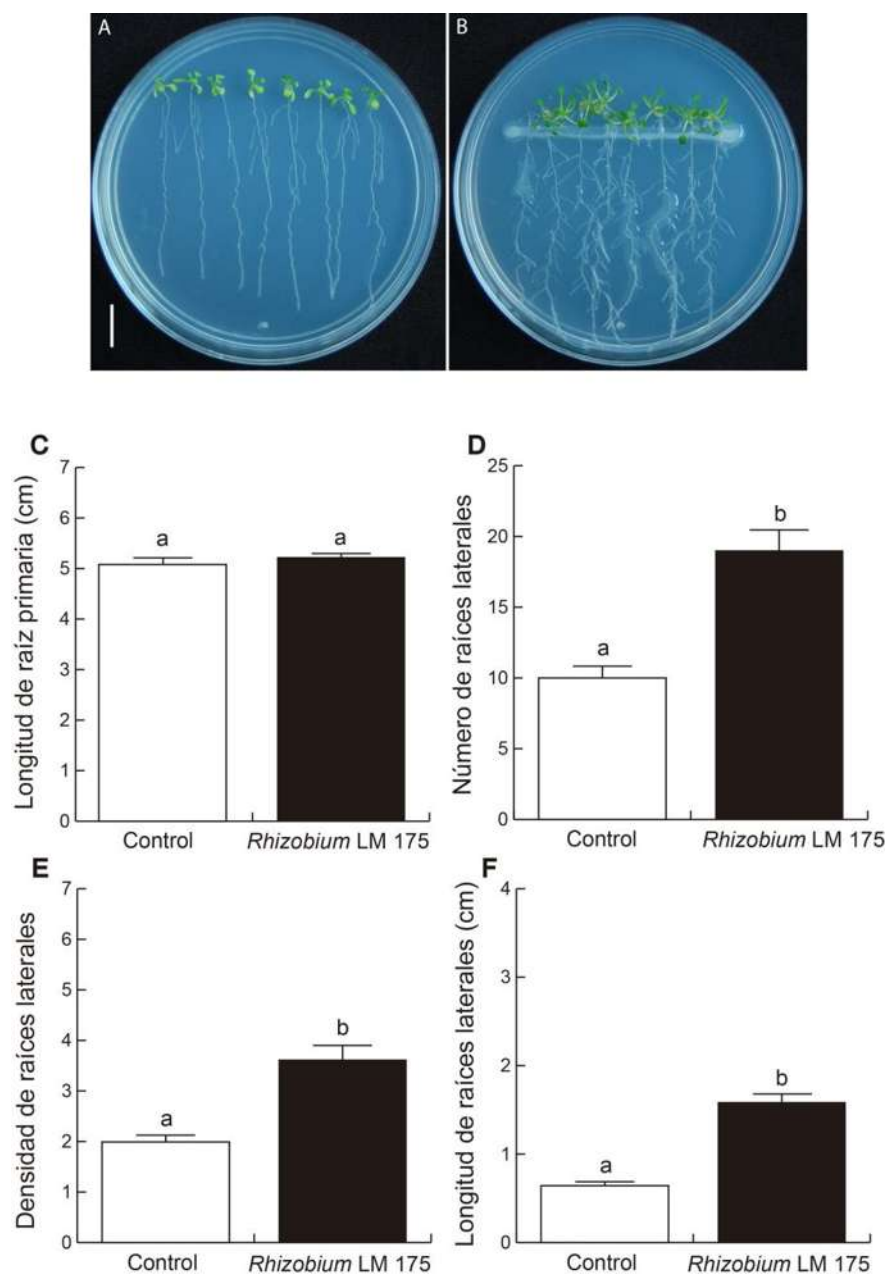


Figura 8. Efecto de la inoculación de *Arabidopsis* con *Rhizobium* LM 175. A).

Plántulas control crecidas en medio MS 0.2x. B). Co-cultivo de plantas con inóculo de *Rhizobium* en un período de interacción de 8 días. C). Crecimiento de la raíz primaria. D). Número de raíces laterales. E). Densidad de raíces laterales. F). Longitud de las raíces laterales. Se analizaron 8 plantas por tratamiento por triplicado. Las barras representan la media $\pm$ error estándar. Las letras corresponden a las medias con diferencias significativas de acuerdo al análisis de Tukey ($p < 0.05$). Barra de escala 1 cm.

7.4. El grupo de *Rhizobium* y *Sinorhizobium* promueve diferencialmente el crecimiento vegetal

Debido al efecto promotor de *Rhizobium* LM 175 sobre el crecimiento de *Arabidopsis*, comparamos si tal promoción también se presenta en otras bacterias del grupo de las Rhizobia y su relación con la respuesta a auxinas. Para ello, plántulas transgénicas que expresan el marcador inducible por auxinas *DR5:uidA* se crecieron en medio MS 0.2x, y a los 4 ddg se transfirieron sobre un inóculo de aislados de *Rhizobium etli*, NGR 234 y cepas de *Sinorhizobium*: GR4, 1021 seq, 2011 y 1021 una mutante en la fijación de nitrógeno *fix f*.

De todas las cepas analizadas, *Rhizobium etli* presentó mayor eficiencia en la colonización del sistema radicular. Al evaluar el efecto sobre la arquitectura de la raíz, las cepas tanto del género *Rhizobium* como *Sinorhizobium* mostraron un incremento en el número, densidad y longitud de raíces laterales, lo anterior sin afectar el crecimiento de la raíz primaria (Fig. 9).

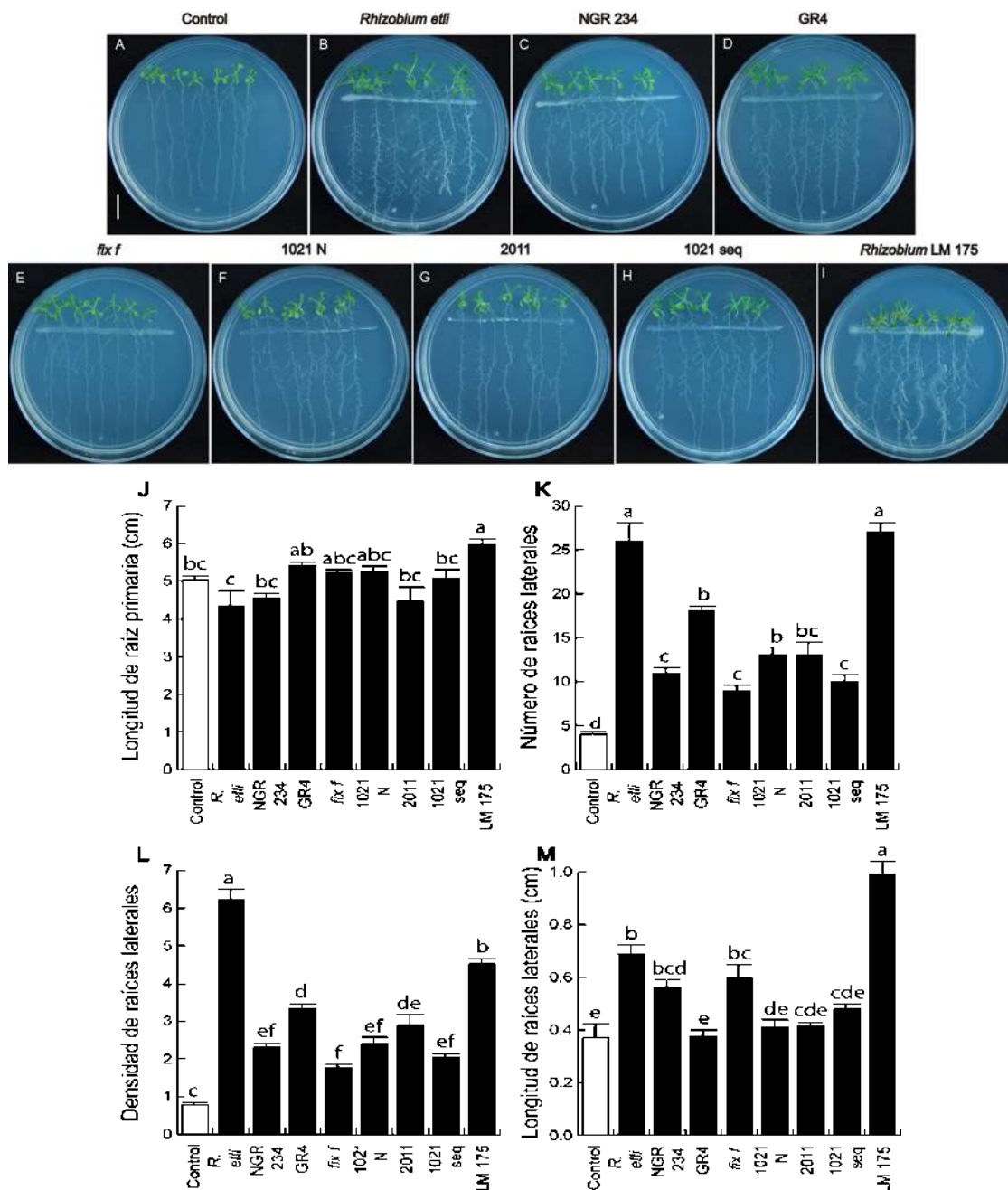


Figura 9. Efecto de la inoculación con las cepas de *Rhizobium* y *Sinorhizobium* sobre la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis*. A). Plantas sin inocular. B-D, I). Plantas inoculadas con *Rhizobium*. E-H). Tratamientos con cepas del género *Sinorhizobium*. J). Longitud de raíz primaria. K). Número de raíces laterales. L). Densidad de raíces laterales. M). Longitud de raíces laterales. 7 plantas fueron evaluadas por triplicado. Las barras representan la media $\pm$ error estándar. Las letras corresponden a las medias con diferencias significativas de acuerdo al análisis de Tukey ($p < 0.05$). Barra de escala 1 cm.

7.5. Respuesta auxínica en plantas inoculadas con *Rhizobium* y *Sinorhizobium*

Las auxinas están involucradas en la formación de raíces laterales y pelos radiculares. El siguiente paso fue estudiar si el efecto bio-estimulante observado con las cepas anteriormente evaluadas era debido a un posible incremento en los niveles endógenos de estos reguladores o a una mayor respuesta. En plántulas crecidas en condiciones axénicas, la expresión del marcador de auxinas *DR5:uidA* se concentró en las puntas de las hojas, zonas meristemáticas y nervaduras, así como en órganos florales, en tanto que en las plantas bacterizadas no se registraron cambios de expresión en la parte aérea (Fig. 10 A). Sin embargo, el tratamiento con las cepas 2011 y *R. etli* provocó una inducción de la expresión en la raíz primaria, en los sitios de formación de raíces laterales y las puntas de las raíces laterales emergidas (Fig. 10 B). Las cepas GR4 y 1021 sólo incrementaron la respuesta auxínica en zonas de emergencia de raíces laterales y las puntas de las mismas. Estos resultados sugieren la existencia de mecanismos diferenciales que modulan la arquitectura de la raíz, dependiendo de la cepa bacteriana en interacción.

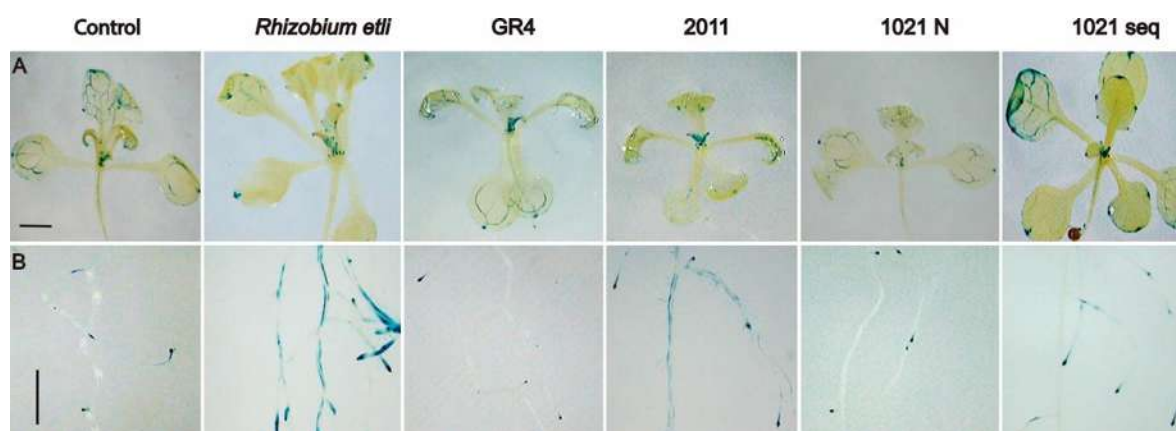


Figura 10. Respuesta de plántulas transgénicas *DR5:uidA* en la interacción con cepas de *Rhizobium* y *Sinorhizobium*. A). Expresión en follaje. B). Expresión en raíz primaria y raíces laterales. Barra de escala 1 mm.

7.6. Efecto de actinobacterias sobre la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis*

Las Actinobacterias están tipificadas como bacterias Gram (+), que son abundantes en el suelo y se caracterizan por producir metabolitos secundarios muy activos con uso potencial en biocontrol, agroindustria, farmacia y en estudios de interacción planta-microorganismo (Doubou et al., 2001).

La secuenciación de los ARN ribosomales de los trece aislados rizosféricos reveló tres actinobacterias que promueven el crecimiento vegetal. Para entender sus mecanismos de promoción del crecimiento, se realizó un ensayo de co-inoculación con *Arabidopsis* en cajas de Petri en contacto directo. A los 4 ddg las plántulas se transfirieron a medio MS 0.2x sobre inóculos bacterianos con *M. luteus*, *Kocuria* sp. y a un doble inóculo, este último tratamiento se hizo para evaluar si el efecto por la inoculación de ambas era sinérgico. A los 8 ddi las plantas control presentaron una raíz primaria de 6.5 cm en promedio y alrededor de 9 raíces laterales. El tratamiento con *M. luteus* y el doble inóculo mostraron un acortamiento de la raíz primaria, mientras que con *Kocuria* sp. no hubo diferencias; sin embargo, todos los tratamientos incrementaron el número, la densidad y la longitud de raíces laterales (Fig. 11).

En ensayos con el doble inóculo, fue interesante observar que las plántulas resistieron la carga bacteriana y estimularon el crecimiento del follaje. De esta manera, se encontró que las actinobacterias promueven el crecimiento vegetal y regulan la arquitectura de la raíz de manera distinta a *Rhizobium* (Fig. 11 D).

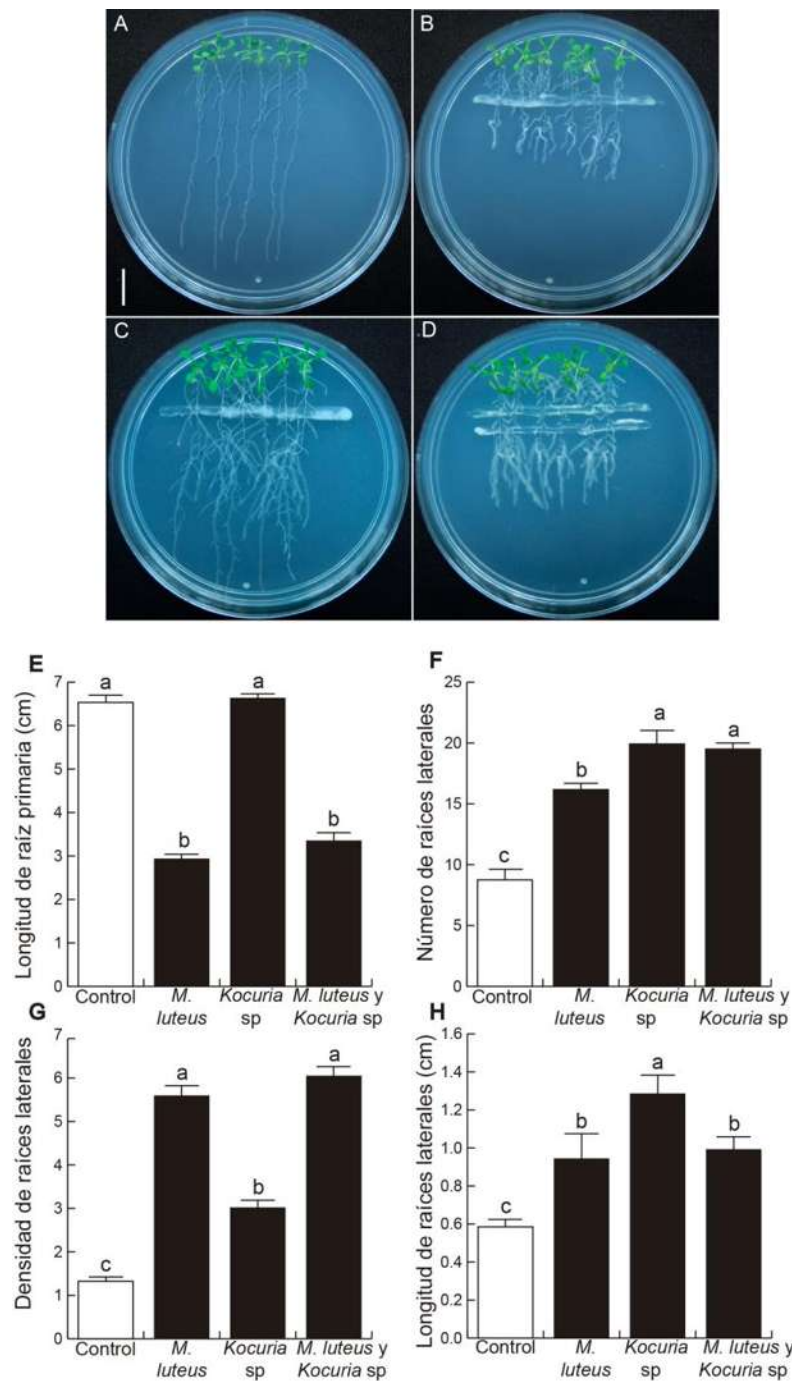


Figura 11. Efecto de la inoculación con actinobacterias sobre la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis*. A). Plántulas silvestres a los 8 ddi sin inocular. B). Plantas inoculadas con *M. luteus*. C). Plantas inoculadas con *Kocuria* sp. D). Plantas inoculadas con *M. luteus* y *Kocuria* sp. E). Longitud de la raíz primaria. F). Número de raíces laterales. G). Densidad de raíces laterales. H). Longitud de raíces laterales. Las barras representan la media $\pm$ error estándar. Las letras corresponden a las medias con diferencias significativas de acuerdo al análisis de Tukey ($p < 0.05$). Barra de escala 1 cm.

Para determinar el impacto de la bacterización sobre la producción de biomasa, se hizo una cuantificación del peso fresco. Al finalizar el experimento (8 ddi), se tomaron fotos representativas de la parte aérea de plántulas sin inocular y con los tratamientos, resaltando el gran tamaño del follaje en las plántulas inoculadas. En las control, la biomasa total fue de 7 mg, este parámetro corresponde al peso del follaje más el peso de la raíz. El tratamiento con *M. luteus* no presentó ningún impacto sobre el incremento de biomasa respecto al control. Por otra parte, *Kocuria* sp. y el doble inóculo incrementaron hasta el doble la biomasa total, siendo las plántulas con los follajes más grandes y con mayor estimulación en el desarrollo de la raíz (Fig. 12).

Los pelos radiculares se originan a partir de células de la epidermis llamadas tricoblastos y tienen gran impacto incrementando el área de exploración del suelo (Satbhai *et al.*, 2015). Por ello, se evaluó el crecimiento de los pelos radiculares en interacción con las Actinobacterias antes mencionadas. La longitud de los pelos radiculares en las plántulas control a los 8 ddi fue en promedio de 0.3 mm, *M. luteus* presentó pelos dos veces más largos con un efecto sinérgico cuando se combina con *Kocuria* sp. (Fig. 13).

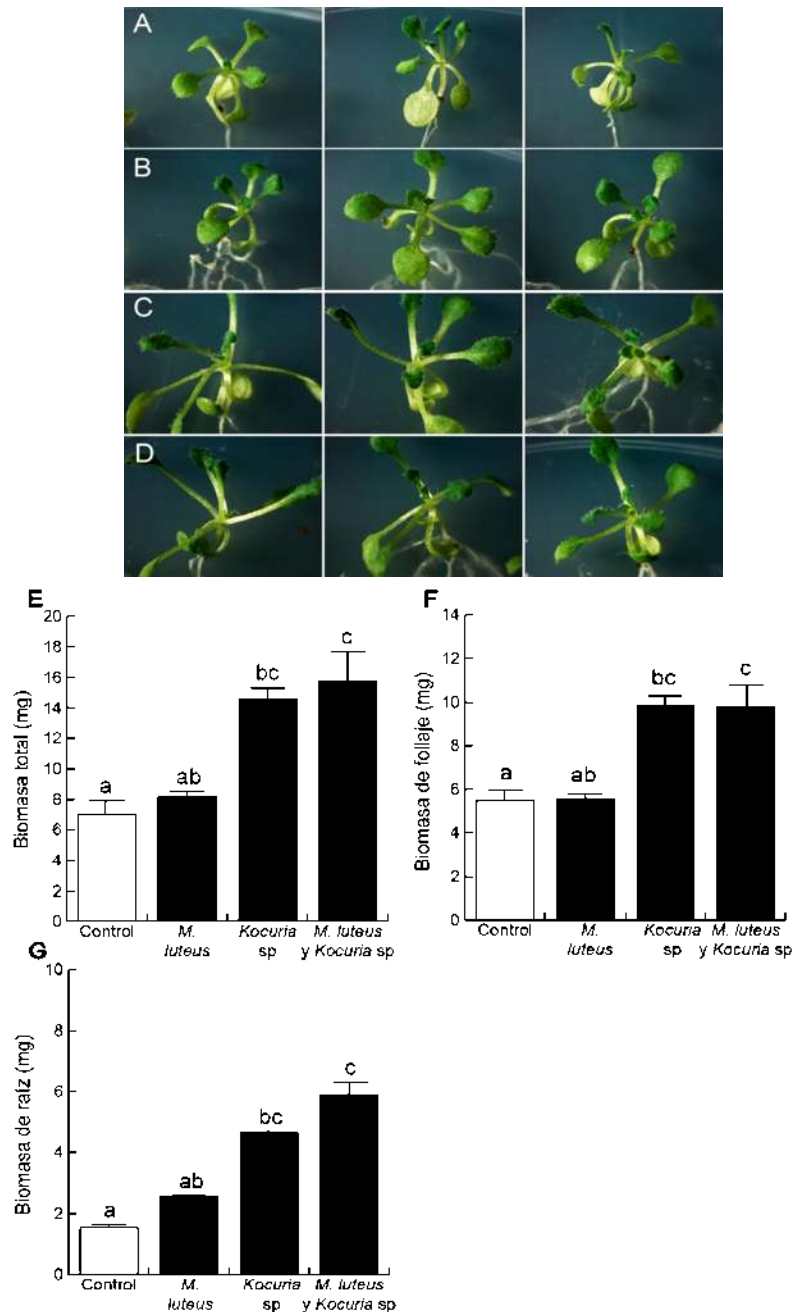


Figura 12. Efecto de la inoculación de actinobacterias en el follaje y peso fresco de *Arabidopsis*. A). Fotografías representativas del follaje de plántulas silvestres a los 8 ddi. B). Follaje de plántulas inoculadas con *M. luteus*. C). Follaje de plántulas inoculadas con *Kocuria* sp. D). Follaje de plántulas inoculadas con *M. luteus* y *Kocuria* sp. E). Peso fresco total. F). Peso fresco de follaje. G). Peso fresco de raíz. Las barras representan la media $\pm$ error estándar. Las letras corresponden a las medias con diferencias significativas de acuerdo al análisis de Tukey ($p < 0.05$).

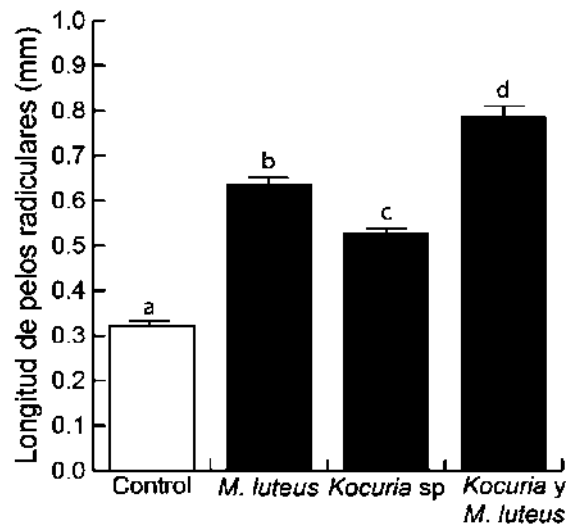


Figura 13. Efecto de la inoculación de actinobacterias sobre la longitud de los pelos radiculares. Se midieron 100 pelos radiculares por tratamiento a los 8 ddi. Las barras representan la media $\pm$ error estándar. Las letras corresponden a las medias con diferencias significativas de acuerdo al análisis de Tukey ($p < 0.05$).

7.7. *Micrococcus luteus* induce la respuesta a auxinas en la raíz primaria

Debido a que las auxinas controlan procesos morfogénicos que podrían estar relacionados con el incremento de biomasa, se analizó la expresión del marcador *DR5:uidA* en respuesta a la inoculación con dos actinobacterias. La expresión en las plantas tratadas con *M. luteus* incrementó en la punta de la raíz primaria, mientras que con *Kocuria* se obtuvo una expresión basal semejante a las plantas sin inocular (Fig. 14).

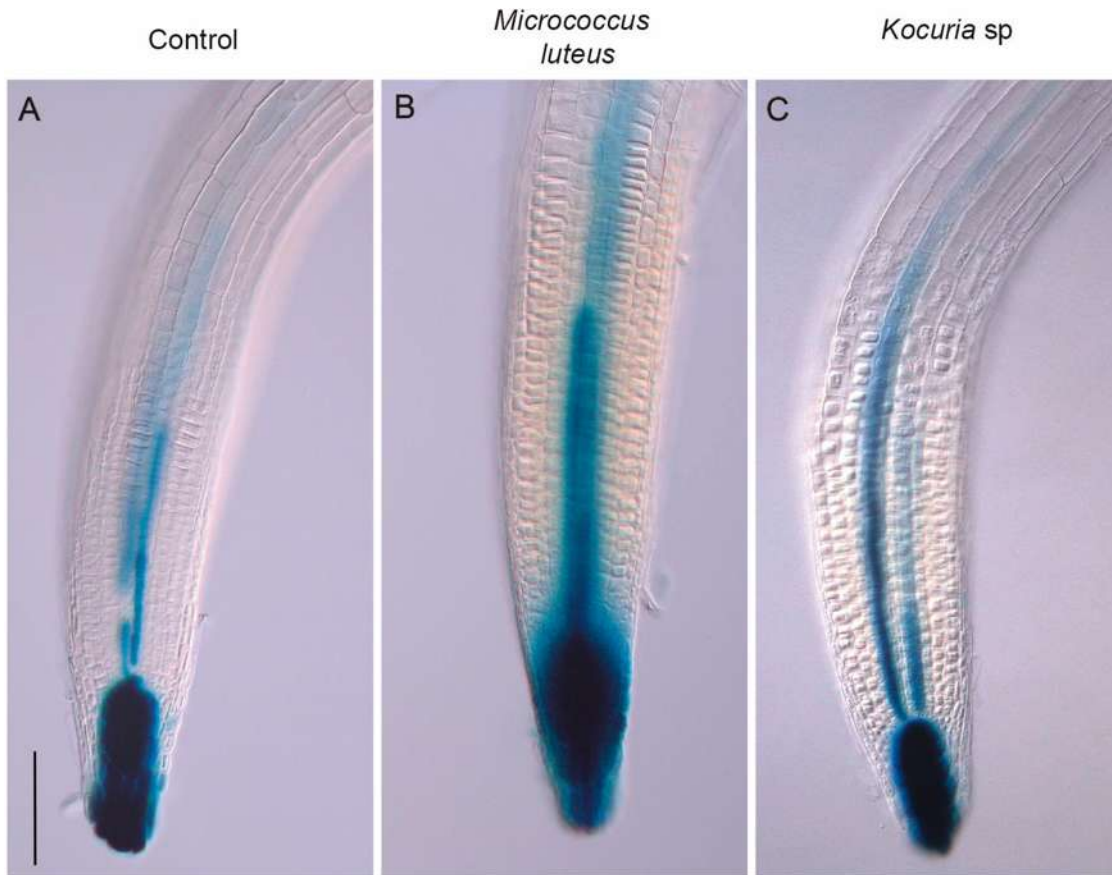


Figura 14. Expresión de *DR5:uidA* en la punta de la raíz de *Arabidopsis thaliana* inoculada con las actinobacterias. A). Expresión basal en plantas sin inocular. B). Expresión en plantas inoculadas con *M. luteus*. C). Expresión en plantas inoculadas con *Kocuria* sp. Barra de escala 100 μ m.

7.8. Cinética de crecimiento vegetal en respuesta a *Micrococcus luteus*

Para entender cómo se relacionan los cambios morfológicos con la expresión auxínica se realizó una cinética con plantas transgénicas *DR5:uidA* durante la interacción con *M. luteus*. Las plántulas control presentaron un crecimiento indeterminado en la raíz primaria y en los primeros 4 días, crecieron continuamente, desarrollaron primordios de raíces laterales que posteriormente emergieron. Conforme transcurrió el tiempo, la raíz primaria fue más larga y las raíces laterales emergidas aumentaron en número y longitud. Las raíces

inoculadas con *M. luteus* presentaron cambios desde el primer día de interacción, con la formación de pelos radiculares cercanos a la punta de la raíz. Durante los primeros 4 días de interacción la raíz primaria se mantuvo corta con pelos radiculares y raíces laterales más abundantes que el control desde el tercer día. En los días posteriores, la raíz primaria de las plantas sin inocular fue más larga y continuó la emergencia de raíces laterales, comparado con el tratamiento, el crecimiento de la raíz primaria fue lento, observando el mantenimiento en la raíz primaria corta y con raíces laterales más abundantes (Fig. 15).

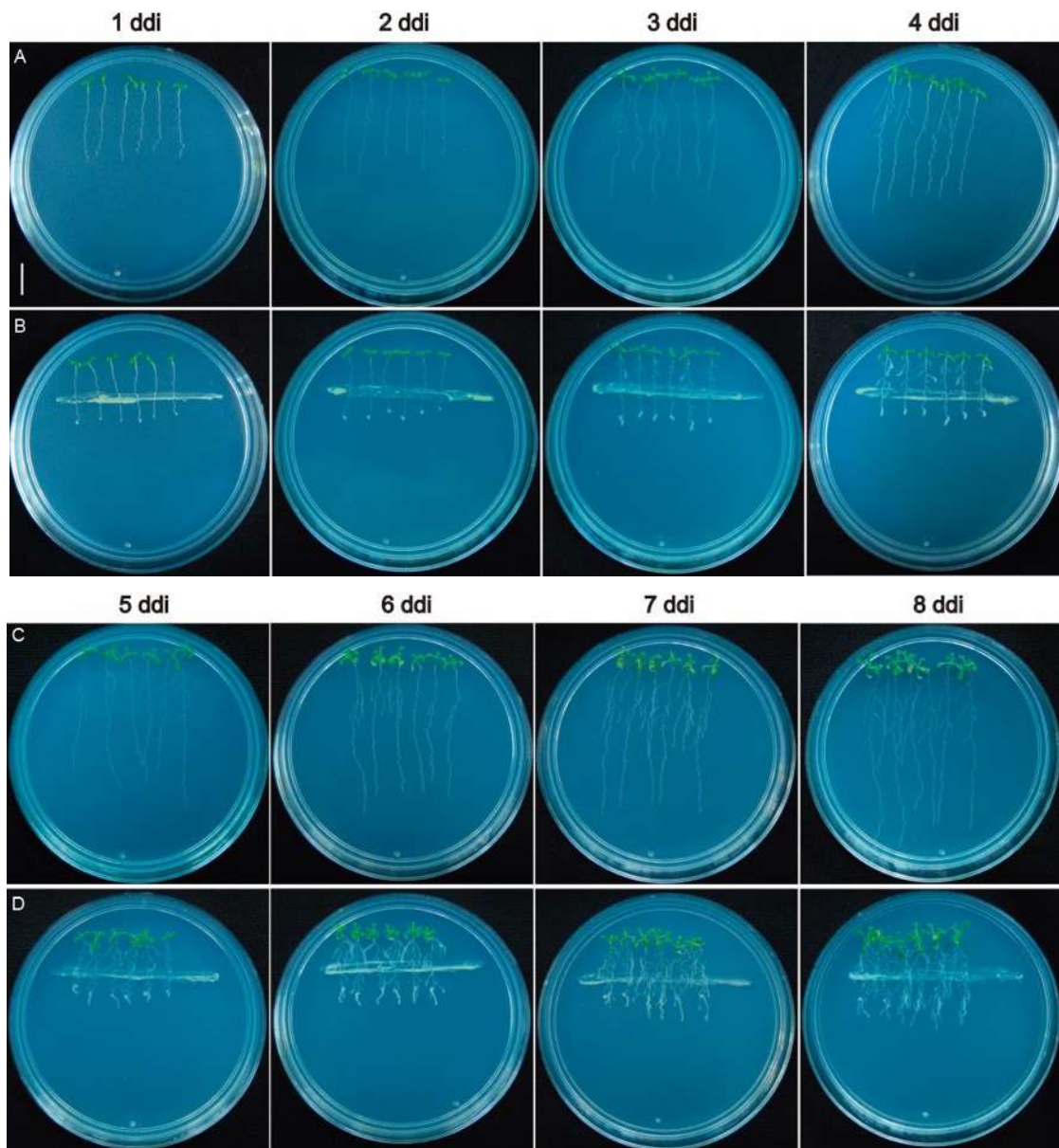


Figura 15. Cinética del desarrollo radicular de *Arabidopsis* en la interacción con *M. luteus*. A). Plántulas silvestres de 4 ddg transferidas a medio MS 0.2x de 1-4 ddi. B). Plántulas inoculadas con *M. luteus* del día 1 al 4 ddi. C). Plántulas silvestres de 4 ddg transferidas a medio MS 0.2x de 5-8 ddi. D). Plántulas inoculadas con *M. luteus* en interacción de 5-8 ddi. Barra de escala 1 cm.

7.9. Cinética de respuesta auxínica en plantas inoculadas con *Micrococcus luteus*

Al analizar la respuesta auxínica con el marcador *DR5:uidA*, se aprecia que los controles presentan una expresión basal en los cotiledones y primordios de raíces laterales, conforme las plantas continúan su crecimiento la expresión se observa en las hojas verdaderas y las raíces laterales emergidas (Fig. 16). Interesantemente, en plantas inoculadas con *M. luteus*, la máxima expresión se alcanza en tiempos cortos, durante los primeros cuatro días y esta expresión va acompañada con la inducción de pelos radiculares (Fig. 16 D, H) y a partir del quinto día, la expresión disminuye paulatinamente (dato no mostrado). Este resultado indica que la respuesta en la arquitectura radicular de plantas tratadas con la bacteria está modulada por compuestos que inducen una respuesta auxínica induciendo una diferenciación temprana y provocando un crecimiento lento en los primeros días de interacción.

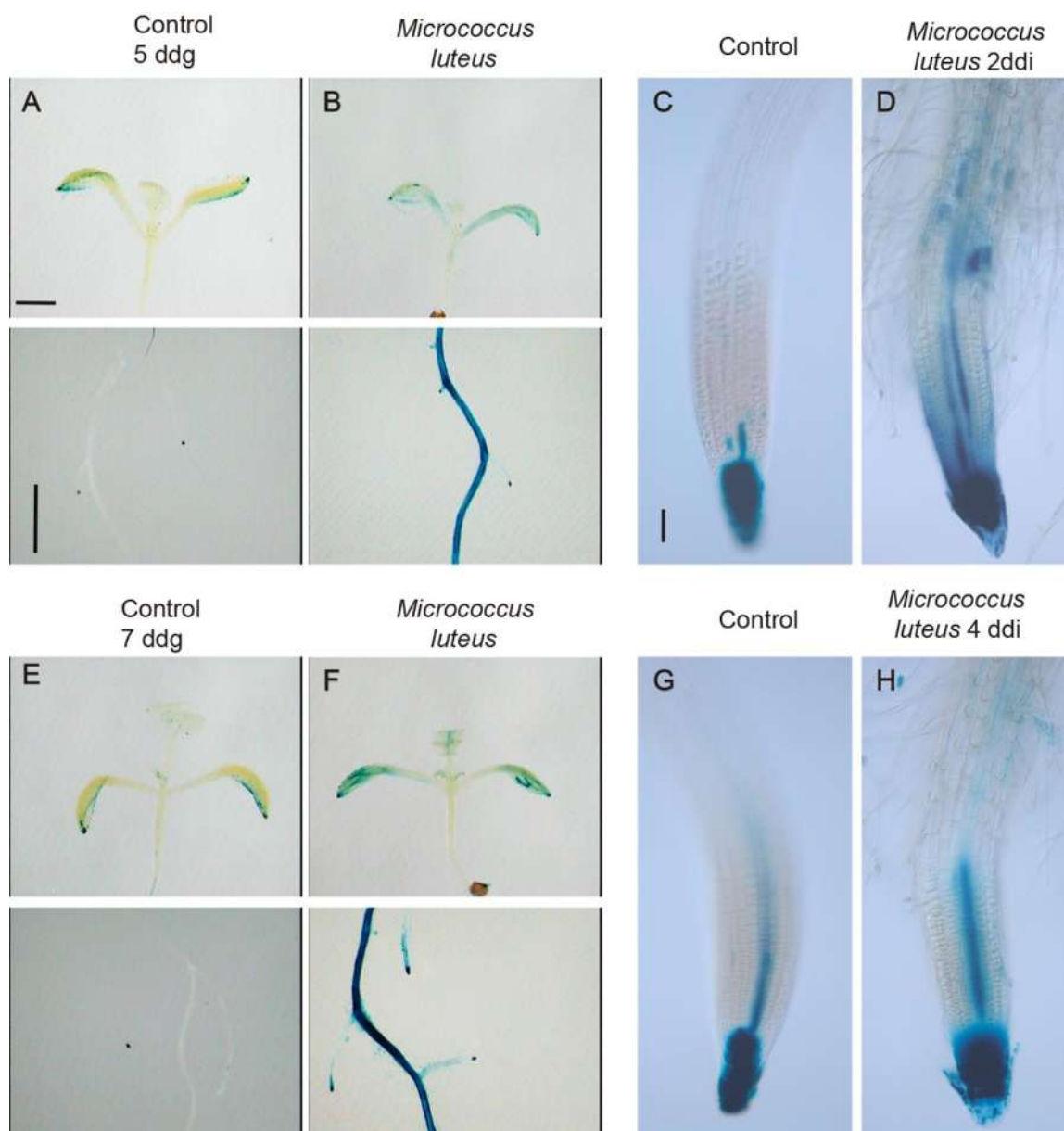


Figura 16. Cinética de la expresión de *DR5:uidA* correspondiente en la interacción de *Arabidopsis* con *M. luteus*. A). Expresión general en plantas silvestres de 5 ddg en cotiledones y raíz primaria. B). Expresión en plantas inoculadas con *M. luteus* a los 2 ddi. C). Expresión basal en la punta de la raíz primaria de plantas sin inocular. D). Inducción del marcador en la punta de la raíz primaria en plantas inoculadas a los 2 ddi. E). Expresión basal en plantas no inoculadas a los 7 ddg. F). Expresión en el follaje y raíz primaria de plantas tratadas con *Micrococcus* a los 4 ddi. G). Expresión en la raíz primaria de plantas sin inocular. H). Expresión en la punta de la raíz primaria con la inoculación. Barra de escala 1 mm.

7.10. El efecto promotor de *M. luteus* en plantas silvestres está relacionado con un mecanismo dependiente de auxinas

De la gran diversidad de procesos que son coordinados por auxinas, la emergencia de raíces laterales está finamente regulada a través del transporte o señalización (Wang y Estelle, 2014). La formación y desarrollo de raíces laterales es un proceso post-embrionario que ocurre a partir de células del periciclo de la raíz primaria. El primordio atraviesa las diferentes capas celulares de la raíz primaria para crecer y desarrollarse como una raíz madura (Casimiro *et al.*, 2003). El siguiente paso fue dilucidar si *M. luteus* podría influir sobre la arquitectura de la raíz en *Arabidopsis* mediante un mecanismo dependiente de los elementos que participan en la vía de señalización por auxinas. Para ello, se crecieron plantas silvestres Col-0 y las mutantes *tir1*, *slr-1*, la doble mutante *arf7/arf19* y la triple mutante *tir1/afb2/afb3* en medio MS 0.2x. Las plantas fueron transferidas a los 4 ddg a placas sin inocular o inoculadas con *M. luteus*. A los 4 días de la interacción se analizó la arquitectura de la raíz de las plantas. Las plantas silvestres inoculadas con *M. luteus* presentaron una raíz primaria más corta con un incremento de raíces laterales comparado con los controles (Fig. 17).

La mutante *tir1* no mostró diferencia en la longitud de la raíz primaria con la inoculación bacteriana, pero incrementó hasta en tres veces el número de raíces laterales. Las mutaciones de *slr1*, *arf7/arf19* y *tir1/afb2/afb3* bloquearon la inhibición del crecimiento de la raíz primaria y la inducción de raíces laterales por *M. luteus*. En conjunto, los resultados sugieren que esta bacteria modula la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis* mediante un mecanismo dependiente de auxinas a través de *SLR1*, *ARF7/ARF19*, *TIR1* y *TIR1/AFB2/AFB3*.

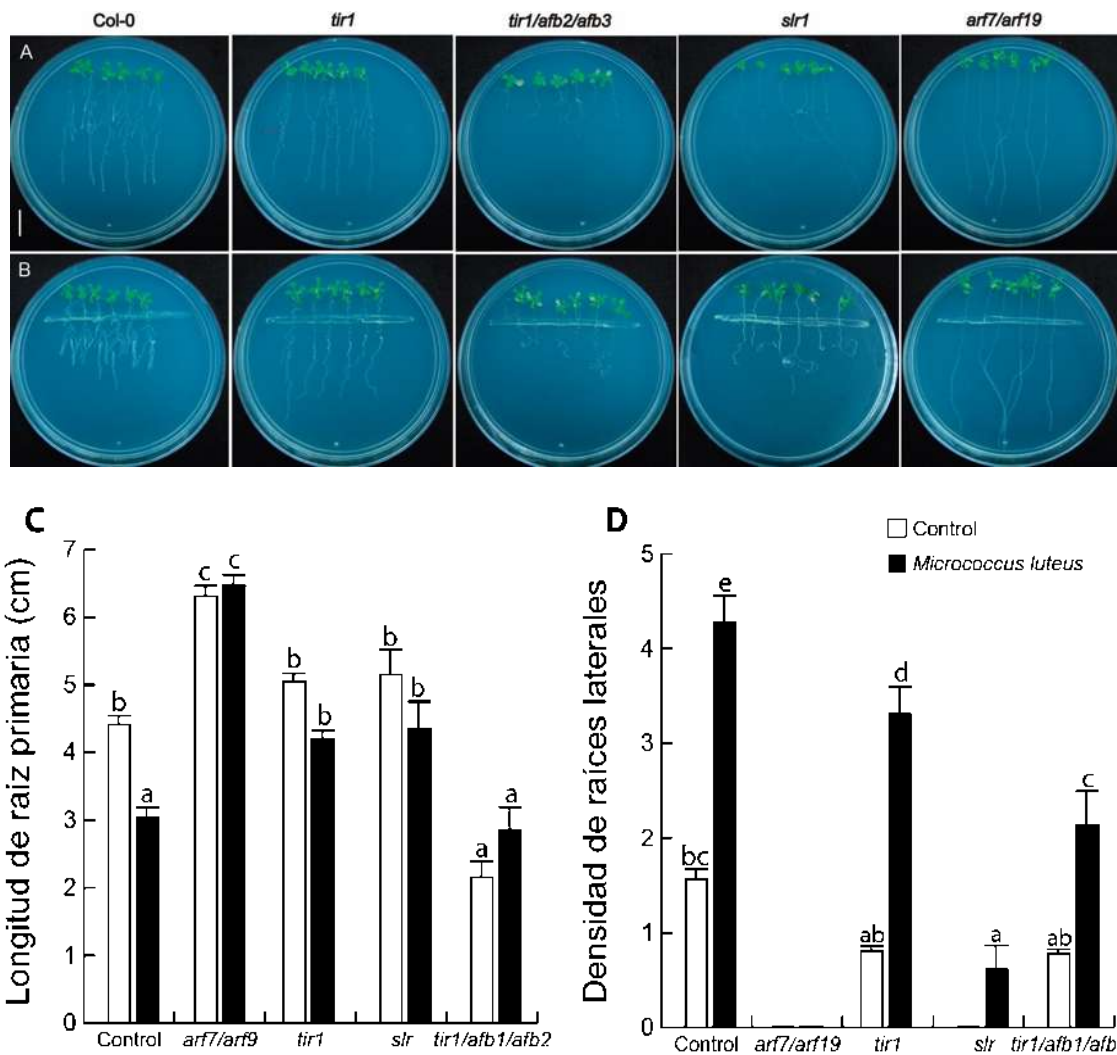


Figura 17. Efecto de las plántulas silvestres y mutantes en elementos de la vía auxínica a la inoculación con *M. luteus*. A). Plantas de 8 ddi sin inocular. B). Plantas inoculadas con *M. luteus*. C). Longitud de raíz primaria. D). Densidad de raíces laterales. Las barras representan la media $\pm$ error estándar. Las letras corresponden a las medias con diferencias significativas de acuerdo al análisis de Tukey ($p < 0.05$). Barra de escala 1 cm.

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La rizósfera es un ambiente que se caracteriza por la enorme actividad microbiana donde las diversas especies de hongos, protozoarios y bacterias interactúan con las plantas. Las raíces son el principal órgano de absorción de nutrientes y agua y contribuyen al establecimiento de poblaciones microbianas produciendo exudados u otras moléculas atrayentes. Por ejemplo, se ha reportado que la producción de ácido málico promueve la colonización de la raíz por *Bacillus subtilis* de manera dosis dependiente pero no de otras especies del mismo género, y esta interacción reduce la susceptibilidad de la planta al ataque por el patógeno foliar *Pseudomonas syringae* (Rudrappa *et al.*, 2008). En maíz, se ha reportado que la producción de benzoxazinoides antimicrobianos repercuten para el crecimiento y establecimiento de comunidades microbianas mientras que para *Pseudomonas putida*, una bacteria tolerante a este compuesto funciona como atrayente (Berendsen *et al.*, 2012). Esto sugiere que las raíces influyen en las propiedades de la rizósfera y confieren cierta especificidad en la composición de sus microbiomas a través de la producción y liberación de exudados radiculares en el suelo, estableciéndose una relación altamente específica.

Diversas PGPR estimulan el crecimiento vegetal por mecanismos directos o indirectos (Badri *et al.*, 2009). La producción de reguladores del crecimiento vegetal, específicamente de auxinas por parte de algunas rizobacterias, influye directamente en el desarrollo de la raíz y fue el marco principal de estudio de este trabajo. El hecho que las auxinas constituyen uno de los principales grupos de reguladores del desarrollo vegetal, permitió plantear la hipótesis de que algunos aislados bacterianos provenientes de rizósferas naturales podrían ejercer sus efectos benéficos sobre las plantas a través de la producción de auxinas.

De una colección de rizobacterias identificadas previamente por métodos moleculares, se encontró que *Rhizobium* LM 175 estimula el crecimiento vegetal,

incrementando el número, densidad y longitud de raíces laterales. Este efecto en la modificación del sistema radicular representa una ventaja para la planta al incrementar el área exploratoria del suelo y el crecimiento en profundidad mejora el anclaje al suelo, lo que permitiría en principio incrementar la adquisición de agua y nutrientes (Smith y De Smeth, 2012). Al evaluar la respuesta a auxinas en plantas que expresan el marcador *DR5:uidA*, se encontró que *Rhizobium* LM 175 incrementa su expresión en hojas verdaderas, raíz primaria y raíces laterales, que coincide con una mayor producción de biomasa. Los parámetros que regulan las dimensiones y tamaño de un órgano son principalmente la división celular y la expansión, procesos que son controlados por auxinas (Kalve *et al.*, 2014). Esto puede sugerir que el aumento en el tamaño de estos órganos en plantas inoculadas correlaciona con un aumento en la respuesta auxínica.

Con el aumento poblacional y la creciente demanda de alimentos, se hace necesario nuevas estrategias para aumentar la producción vegetal de manera que el impacto negativo causado por el uso de fertilizantes y agroquímicos disminuya. *Rhizobium* es mejor conocido por la formación de nódulos en la raíz de plantas leguminosas, en las que promueve la fijación biológica de nitrógeno (Datta *et al.*, 2015). Además de la fijación de nitrógeno, también se ha reportado la producción de ácido indol-3-acético por *Rhizobium* en medios de cultivo suplementados con triptófano (Datta y Basu, 2000). Los resultados del presente estudio demostraron los efectos de los Rhizobia como grupo, ya que varios aislados de *Rhizobium* y *Sinorhizobium* estimularon el crecimiento de *Arabidopsis in vitro*, que confirman resultados previos obtenidos en especies hortícolas y en cultivos, por ejemplo en tomate (*Solanum lycopersicum*), maíz (*Zea mays*), lechuga (*Lactuca sativa*) y arroz (*Oryza sativa* L.) (Chabot *et al.*, 1996, Yanni *et al.*, 2001, García-Fraile *et al.*, 2012).

Por otra parte, son pocos los trabajos que muestran la modificación en los niveles endógenos de auxinas mediante la expresión de su marcador correspondiente, *DR5:uidA* en plantas como resultado de la inoculación con PGPRs. Existe un

estudio que relaciona la bioestimulación plántulas de *Arabidopsis* con la producción de auxinas por *Azospirillum brasilense*, mediante la mutación del gen *ipdC* que codifica para una enzima involucrada en la biosíntesis de auxinas en la bacteria. Aquellas plántulas tratadas con la mutante no presentaron un efecto promotor, comportándose como las control, mientras que con la cepa silvestre se ve mejorada la elongación y número de los pelos radiculares con una raíz primaria corta, similar al fenotipo causado por auxinas (Spaepen *et al.*, 2014). La homeostasis de auxinas se regula mediante el transporte, biosíntesis, conjugación y degradación. En este aspecto, la inducción en la expresión del marcador de respuesta a auxinas fue diferencial para cada uno de los aislados que se caracterizaron (Fig. 10 A, B y 14 B, C). El mecanismo por el cual los niveles internos de auxinas en la raíz se ven modificados puede explicarse por la producción de AIA por las bacterias, como parte de su metabolismo, o como una estrategia de las bacterias para interactuar con la planta de manera que puedan cambiar los niveles de auxinas en la colonización de la raíz (Spaepen y Vanderleyden, 2011). En el caso de *Rhizobium* la producción de AIA se ha relacionado con la producción de flavonoides y factores NodD necesarios para la nodulación. En un estudio se encontró que la cepa NGR234 sintetiza auxinas por tres vías distintas y el locus río abajo del promotor nod NB15 codifica para proteínas involucradas en la síntesis de AIA, donde la falta de estas proteínas repercute en la formación de nódulos con menor cantidad de AIA (Theunis *et al.*, 2004; Gosh y Basu, 2006; Mathesius, 2008). Mientras que los flavonoides, los cuales son secretados por las plantas como metabolitos secundarios que son percibidas por las bacterias, tienen un papel importante al inducir la transcripción de factores Nod bacterianos para inducir la formación de nódulos.

De la gran diversidad de microorganismos que interactúan con las plantas destaca el grupo de las actinobacterias, por su característica en la producción de metabolitos secundarios (Hamedi y Mohammadipanah, 2014). En este estudio encontramos que las actinobacterias *Micrococcus luteus* y *Kocuria* sp. promueven el crecimiento de *Arabidopsis* en inoculaciones sencillas o combinadas. En el

sistema de un solo inóculo, y a diferencia de las *Rhizobia*, *M. luteus* causó la formación de una raíz primaria corta con un incremento en el número de raíces laterales. En el caso de *Kocuria*, la raíz primaria es larga como en las plantas control, pero con un incremento en la formación de raíces laterales (Fig. 11 C, F). Es importante resaltar que aún con la enorme carga bacteriana observada con *Rhizobium* y Actinobacterias, no hay un efecto represor en el crecimiento del follaje, sino que se favorece la producción de biomasa. En la rizósfera, la colonización de la raíz podría ser benéfica para las plantas que puede resultar en una cooperación positiva para las especies bacterianas, en este contexto, nuestros resultados (Fig. 11 D) indican que es posible establecer consorcios de dos o más bacterias con efectos sinérgicos (Fig. 13) para generar formulaciones susceptibles de ser aplicadas en el campo (Farrar *et al.*, 2014).

Los efectos de *M. luteus* y *Kocuria* sp. en la formación de pelos radiculares y raíces laterales se podría explicar por la acción de auxinas y/o etileno, ya que la aplicación de estos reguladores mimetiza los efectos de las bacterias (Muday *et al.*, 2012). Sin embargo, para *Kocuria* sp. no se observó una respuesta en el marcador *DR5:uidA* (Fig. 14 C), atribuible a las modificación en la arquitectura del follaje y la raíz, así como la longitud de los pelos, lo que sugiere un mecanismo de regulación distinto a auxinas. Por el contrario, el fenotipo en plantas de *Arabidopsis* por la inoculación de *Micrococcus* es una respuesta característica de auxinas (Fig. 11 B). En este aspecto y a diferencia del grupo de *Rhizobium*, *Micrococcus* acortó la raíz primaria mientras que ambos microorganismos inducen la respuesta auxínica en la planta.

El etileno, por otra parte, tiene funciones importantes en la modulación de procesos en el crecimiento como el tamaño celular, la restricción de la elongación y la división celular, así como procesos del desarrollo como la senescencia, abscisión, maduración, respuesta a defensa y estrés (Schaller, 2012). Los altos niveles de auxinas en la planta mejoran la biosíntesis de ácido 1-

aminociclopropano carboxílico (ACC), el precursor de etileno, provocando su acumulación e inhibiendo el crecimiento de la raíz (Ahmed y Hasnain, 2014; Glick, 2014). Respecto a esta relación de auxinas y etileno en la estimulación del crecimiento vegetal, existe amplia evidencia que los microorganismos que producen ACC desaminasa, enzima que hidroliza el ACC convirtiéndolo en α -cetobutirato y amonio, reducen los niveles de etileno y mejoran el crecimiento (Himadri *et al.*, 2013; Gamalero y Glick, 2015). Es posible que el grupo de *Rhizobium* a diferencia de *M. luteus* produzca esta enzima y tenga así un impacto en la arquitectura de las plantas promoviendo la longitud de la raíz primaria y las raíces laterales. En este aspecto, las implicaciones que tiene la producción de ACC desaminasa por microorganismos en la agricultura representa una estrategia en la búsqueda de resistencia de las plantas hacia estrés biótico y abiótico (Esquivel-Cote *et al.*, 2013).

En respuesta a *M. luteus*, se observó una restricción del crecimiento de la raíz primaria acompañada de la formación de pelos radiculares en la punta de la raíz en tiempos tempranos a la inoculación (Fig. 15 B y D). Un efecto similar en el arresto en el crecimiento de la raíz primaria y la diferenciación celular se ha observado en varias especies de cactáceas donde factores como la baja disponibilidad de agua y nutrientes causan un programa de crecimiento determinado en el que el crecimiento cesa y el meristemo apical radicular deja de dividirse, en consecuencia, las células del meristemo se diferencian, y la epidermis produce pelos radiculares (Shishkova *et al.*, 2008). En *Arabidopsis* se ha reportado que la deficiencia de fósforo induce la entrada de la raíz a un programa de crecimiento, alterándose tanto la morfología como diferenciación celular epidérmica (Sánchez-Calderón *et al.*, 2005). En el caso de la inoculación bacteriana, se observó un crecimiento restringido de la raíz primaria, pero la morfología y organización de las células en el meristemo no se vieron modificadas (Fig. 16 D, H), con ello se puede concluir que a diferencia de un programa de crecimiento determinado, la planta tiene un crecimiento lento en respuesta a la inoculación, en el que no se compromete la división celular.

La comparación del crecimiento de la raíz primaria y la formación de raíces laterales en plantas silvestres y en las mutantes de la vía de señalización de las auxinas, confirmó que la inoculación con *M. luteus* activa el crecimiento vegetal mediante un mecanismo auxínico, ya que las mutantes mostraron respuestas disminuidas ante la inoculación.

De acuerdo a lo observado en la longitud de la raíz primaria con la inoculación bacteriana hay una resistencia en el acortamiento de la raíz primaria en las mutantes *arf7/arf19*, *tir1/afb2/afb3*, y resistencia parcial con las mutantes *slr1* y *tir1*, lo que sugiere un mecanismo dependiente de estos elementos en la elongación de la raíz primaria. La formación de raíces laterales implica procesos de división celular en el periciclo que está estrechamente ligado con los niveles de auxinas, este proceso se divide en ocho etapas, en los primeros estadios, células fundadoras del periciclo llevan a cabo divisiones asimétricas, posteriormente se dividen periclinalmente formando una estructura en forma de domo hasta que emergen y su regulación está relacionada con elementos de la vía auxínica y transporte (Péret *et al.*, 2009). Cuando se interrumpe el transporte de auxinas por inhibidores, las células no entran a mitosis, manteniéndose en fase G1 y al adicionar auxinas se da la transición de G1-S. Por otra parte, la inducción en la formación de las raíces laterales por *M. luteus* requiere en gran medida de los genes *SLR1*, *ARF7* y *ARF19*, los cuales codifican para el módulo represor transcripcional/factores de transcripción (IAA14/ARF7, ARF19), respectivamente, de la vía de señalización de auxinas, debido a que mutaciones en los mismos bloquean por completo la formación de estas estructuras (Fig. 17) por la incapacidad de las células fundadoras del periciclo para llevar a cabo divisiones celulares. La relación entre el ciclo celular y *slr* en este proceso se ha visto en estudios donde genes del ciclo celular no se expresan en el fondo mutante y la sobreexpresión de ciclina D (*CycD3;1*), un componente involucrado en la transición de G1-S induce divisiones anticlinales en el periciclo pero la iniciación de raíces laterales no se lleva a cabo. Adicionalmente, se ha observado que

ARF7/ARF19 y *SLR* interactúan, donde *SLR* inhibe la actividad de ARF para bloquear la iniciación de raíces laterales (Péret *et al.*, 2009; Vanneste *et al.*, 2005). *TIR1* codifica para el receptor de auxinas e interactúa con represores transcripcionales de la familia Aux/IAA. En *Arabidopsis* existen 29 Aux/IAA, uno de ellos, *IAA8*, se encontró que regula la formación de raíces laterales a través de la interacción con *TIR1* y proteínas ARF, a diferencia de los demás IAA, este elemento es de localización citosólica y nuclear (Arase *et al.*, 2012).

Adicionalmente, la menor formación de raíces laterales en la mutante *tir1* en co-cultivo con la bacteria sugiere que *TIR1* participa de manera parcial durante dicho proceso, lo anterior es consistente con una formación de raíces laterales más escasa en la triple mutante inoculada, ya que dicha mutante además de estar afectada en *TIR1* también lo está en *AFB2* y *AFB3*, los cuales al igual que *TIR1* codifican para receptores de auxinas siendo redundantes en su funcionamiento. Lo anterior sugiere una participación más amplia de varios de ellos en el mismo proceso biológico (Fig. 17 D).

9. LITERATURA CITADA

- Ahmed A, y Hasnain S** (2010). Auxin-producing *Bacillus* sp.: Auxin quantification and effect on the growth of *Solanum tuberosum*. *Pure and Applied Chemistry* 82:313-319.
- Ahmed A, y Hasnain S** (2014). Auxins as one of factors of plant growth improvement by plant growth promoting rhizobacteria. *Polish Journal of Microbiology* 63:261-266.
- Alger EB** (2004). Endocannabinoids: Getting the message across. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:8512-8513.
- Annapurna K, Kumar A, Kumar VL, Govindasamy V, Bose P y Ramadoss D** (2013). PGPR-Induced Systemic Resistance (ISR) in plant disease management. Chapter 15, D.K. Maheshwari (ed), *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management*.
- Arase F, Nishitani H, Egusa M, Nishimoto N, Sakurai S, Sakamoto N y Kaminaka H** (2012). IAA8 involved in lateral root formation interacts with the TIR1 auxin receptor and ARF transcription factors in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 7:1-9.
- Badri VD, Weir LT, Lelie VD y Vivanco MJ** (2009). Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Current Opinion in Biotechnology* 20:642-650.
- Bais HP, Park SW, Weir TL, Callaway RM y Vivanco JM** (2004). How plants communicate using the underground information superhighway. *TRENDS in Plant Science* 9:1360-1385.
- Bashan Y y de-Bashan EL** (2010). How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth-a critical assessment. *Advances in Agronomy* 108:78-122.
- Berendsen RI, Pieterse CMJ y Bakker PAHM** (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science* 17:478-486.
- Bhusan BH, Das S, Dangar KT y Adhya KT** (2013). ACC deaminase and IAA producing growth promoting bacteria from the rhizosphere soil of tropical rice plants. *Journal of Basic Microbiology* 53:972-984.
- Blancaflor BE, Kilaru A, Keereetaweep J, Khan RB, Faure L y Chapman** (2014). N-acyl ethanolamines: lipid metabolites with functions in plant growth and development. *Plant Journal* 79:568-583.

- Calderón AIL, Lee S, De Oliveira C, Ivetac A, Brandt W, Armitage L, Sheard BL, Tan X, Parry G, Mao H, Zheng N, Napier R, Kepinsky S y Estelle M** (2012). A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nature Chemical Biology* 8:477-485.
- Causier B, Lloyd J, Stevens L y Davies B** (2012). TOPLESS co-repressor interactions and their evolutionary conservation in plants. *Plant Signaling & Behavior* 7:325-328.
- Casimiro I, Beeckman T, Graham N, Bhalerao R, Zhang H, Casero P, Sandberg G y Nenett JM** (2003). Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends in Plant Science* 8:165-171.
- Chabot R, Antoun H, Cescas MP** (1996). Growth promotion of maize and ollettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Plant Soil* 184:311-321.
- Chowdhury PS, Hartman A, Gao X y Borris R** (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42-a review. *Frontiers in Microbiology* 6:1-11.
- Colón-Carmona A, You R, Haimovitch-Gal T y Doemer P** (1999). Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant Journal* 20:503-508.
- Dastager SG, Deepa CK y Pandey A** (2010). Isolation and characterization of novel plant growth promoting *Micrococcus* sp NII-0909 and its interaction with cowpea. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:987-992.
- Datta A, Singh KR, Kumar S y Kumar S** (2015). An effective and beneficial plant growth promoting soil bacterium "*Rhizobium*": A review. *Annals of Plant Sciences* 933-942.
- Datta C y Basu PS** (2000). Indole acetic acid production by a *Rhizobium* species from root nodules of a leguminous shrub, *Cajanus cajan*. *Microbiological Research* 155: 123-127.
- Dharmasiri N, Dharmasiri S y Estelle M** (2005). The F-box protein TIR 1 is an auxin receptor. *Nature* 435:441-445.
- Dimpka OC, Zeng J, McLean EJ, Britt WD, Zhan J y Anderson JA** (2012). Production of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in the plant-benefical bacterium *Pseudomonas chloraphis* O6 is inhibited by ZnO nanoparticles but enhanced by CuO nanoparticles. *Applied and Environmental Microbiology* 78:1404-1410.

- Doumbou LC, Salove HKM, Crawford LD y Beaulieu C** (2001). Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection*. 82:85-102.
- Du YL, Shen XL, Yu P, Bai LQ y Li YQ** (2011). Gamma-butyrolactone regulatory system of *Streptomyces chattanoogensis* links nutrient utilization, metabolism, and development. *Applied Environmental Microbiology* 77:8415-8426.
- Dudareva N, Klempien A, Muhlemann JK y Kaplan I** (2013). Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist* 198:16-32.
- Esquivel-Cote R, Gavilanes-Ruiz M, Cruz-Ortega R y Huante P** (2013). Importancia agrobiológica de la enzima ACC desaminasa en rizobacterias, una revisión. *Revista Fitotecnica Mexicana* 36:251-258.
- Farrar K, Bryant D y Cope-Shelby N** (2014). Understanding and engineering beneficial plant-microbe interactions: plant growth promotion in energy crops. *Plant Biotechnology Journal* 12:1193-1206.
- Francis I, Holsters M y Vereecke D** (2010). The gram-positive side of plant-microbe interactions. *Environmental Microbiology* 12:1-12.
- Fukaki H, Tameda S, Masuda H y Tasaka M** (2001). Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the *SOLITARY-ROOT/IAA14* gene of *Arabidopsis*. *Plant Journal* 29:153-168.
- Gage JD** (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Review* 68:280-300.
- Gamalero E y Glick RB** (2015). Bacterial modulation of plant ethylene levels. *Plant Physiology* 169:13-22.
- García-Fraile P, Carro L, Robledo M, Ramírez-Bahena MH, Flores-Félix D, Fernández MT, Mateos PF, Rivas R, Igual JM, Martínez-Molina E, Peix A y Velázquez E** (2012). *Rhizobium* promotes non-legumes growth and quality in several production steps: Towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. *PloS one* 7:1-7.
- Ghosh S y Basu PS** (2006). Production and metabolism of indole acetic acid in roots and root nodules of *Phaseolus mungo*. *Microbiological Research* 161:362-366.

- Glick RB** (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research* 169:30-39.
- Goswami D, Pithwa S, Dhandhukia P y Thakker NJ** (2014). Delineating *Kocuria turfanensis* 2M4 as a credible PGPR: a novel IAA-producing bacteria isolated from saline desert. *Journal of Plant Interactions* 9:566-576.
- Gutierrez Mañero FJ, Ramos-Solano B, Probanza A, Mehouchi J, Tadeo FR y Talon M** (2011). The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum*. 111:206-211.
- Hamed J y Mohammadipana F** (2014). Biotechnological application and taxonomical distribution of plant growth promoting actinobacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 42:157-171.
- Hernández-Reyes C, Schenk TS, Neumann C, Kogel HK y Schikora A** (2014). N-acyl-homoserine lactones-producing bacteria protect plants against plant and human pathogens. *Microbial Biotechnology* 1-9.
- Himadri BB, Subhasis D, Tushar KD y Tapan KA** (2013). ACC deaminase and IAA producing growth promoting bacteria from the rhizosphere soil of tropical rice plants. *Journal of Basic Microbiology* 53:972-984.
- Hodge A, Berta G, Doussan C, Merchan F y Crespi M** (2009). Plant root growth, architecture and function. *Plant Soil* 321:153-187.
- Huot B, Yao J, Montgomery B y Yang HS** (2014). Growth-defense tradeoffs in plants: A balancing act to optimize fitness. *Molecular Plant* 7:1267-1287.
- Kalve S, De Vos D y Beemster TSG** (2014). Leaf development: a cellular perspective. *Frontiers in Plant Science*. 5:1-25.
- Khamna S, Yokota A, Peberdy JF y Lumyong S** (2010). Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. *EurAsian Journal of Biosciences* 4:23-32.
- Korasick AD, Enders AT y Strader C** (2013). Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany* 64:2541-2555.
- Kramer ME y Ackelsberg ME** (2015). Auxin metabolism rates and implications for plant development. *Frontiers in Plant Science* 6:150.
- Kumar A, Prakash A y Johri BN** (2011). *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem. Maheshwari DK (ed) *Bacteria in Agrobiotechnology: Crop Ecosystems* (pp37-60). Barkatulla University, Bhopal Madhya Pradesh, India.

- Lavenus J, Goh T, Roberts I, Guyomarch S, Lucas M, De Smert I, Fukaki HM Beeckman T, Bennett M y Laplaze L** (2013). Lateral root development in *Arabidopsis*: fifty shades of auxin. *Trends in Plant Science* 1059:1-9.
- Liu CW, Sung Y, Chen BC y Lai HY** (2014). Effect of nitrogen fertilizers on the growth and nitrate content of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *International Journal of Environment Research and Public Health* 11:4427-4440.
- López-Bucio J, Acevedo-Hernández G, Ramírez-Chávez E, Molina-Torres J y Herrera-Estrella L** (2006). Novel signals for plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 9:523-529.
- López-Bucio J, Cruz-Ramírez A y Herrera-Estrella L** (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology* 6:280-287.
- Ludwig Müller J** (2011). Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany* 62:1757-1773.
- Ljung K** (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* 140:943-950.
- Malamy JE y Benfey PN** (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124:33-44.
- Mano Y y Nemoto K** (2011). The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany* 63:2853-2872.
- Marín-Loaiza JC y Céspedes LC** (2007). Volatile compounds from plants. Origin, emission, effects, analysis and agro applications. *Revista Fitotecnia Mexicana* 30:327-351.
- Mathesius U** (2008) Auxin: at the root nodule development?. *Functional Plant Biology* 35:651-668.
- McNear Jr HD** (2013) The rizosphere-roots, soil and everything between. *Nature Education Knowledge* 4:1.
- Méndez-Bravo A, Calderón-Vásquez C, Ibarra-Laclette E, Raya-González J, Ramírez-Chávez E, Molina-Torres J, Guevara-García AA, López-Bucio J y Herrera-Estrella L** (2011). Alkamides activate jasmonic acid biosynthesis and signaling pathways and confer resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 6:1-15.
- Miller BM y Bassler BL** (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology* 55:165-199.
- Muday KG, Rahman A y Binder MB** (2012). Auxin and ethylene: collaborators or competitors?. *Trends in Plant Science* 17:181-195.

- Murashige T y Skoog F** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Okushima Y, Fukaki H, Onoda M, Theologis A y Tasaka M** (2007). ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of *LBD/ASL* genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 19:118-130.
- Ortíz-Castro R, Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L y López-Bucio J** (2009). The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior* 4:701-712.
- Ortíz-Castro R, Díaz-Pérez C, Martínez-Trujillo M, del Río RE, Campos-García J y López-Bucio J** (2011). Transkingdom signaling based on bacterial cyclopeptides with auxin activity in plants. 108:7253-7258.
- Ortíz-Castro R, Martínez-Trujillo M y López-Bucio J** (2008). N-acyl-homoserine lactones: a class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell and Environment* 31:1497-1509.
- Ortíz-Castro R, Valencia-Cantero E y López-Bucio J** (2008). Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. *Plant Signaling and Behavior* 3:263-265.
- Ouzari H, Khsairi A, Raddadi N, Jaoua L, Hassen A, Zarrouk M, Daffonchio D y Boudabous A** (2008). Diversity of auxin-producing bacteria associated to *Pseudomonas savastanoi*-induced olive knots. *Journal of Basic Microbiology* 48: 370-377.
- Pacifici E, Polverari L y Sabatini S** (2015). Plant hormone cross talk: the pivot of root growth. *Journal of Experimental Botany* 66:1113-1121.
- Panoli A, Martin MV, Alandete SM, Simon M, Neff C, Swarup R, Bellido A, Yuan L, Pagnussat CG, Sundaresan V** (2015). Auxin import and local auxin biosynthesis are required for mitotic divisions, cell expansion and cell specification during female gametophyte development in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 10:1-23.
- Patil V** (2011). Production of indole acetic acid by *Azotobacter* sp. *Recent Research in Science and Technology* 3:14-16.
- Park YG, Mun BG, Kang SM, Hussain A, Shahzad R, Seo CW, Yun BW** (2017). *Bacillus aryabhatai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones. *PLoS ONE* 12:1-28.

- Parmar N y Dufresne J** (2011). Beneficial interactions of plant growth promoting rizosphere microorganisms. A. Singh *et al.* (eds). *Bioaugmentation and Biocontrol, Soil Biology* 28 pp 27-43. Ontario, Canada. Ed. Springer.
- Parry G, Calderón-Villalobos LI, Prigge M, Péret B, Dharmasiri S, Itoh H, Lechner E, Gray WM, Bennett M y Estelle M** (2009). Complex regulation of the TIR1/AFB family of auxin receptors. *Proceedings of the National Academy of Science* 106:22540-22545.
- Péret B, De Rybel B, Casimiro I, Benková E, Swarup R, Laplaze L, Beeckman T y Bennett JM** (2009). *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends in Plant Science* 14:7. 399-408.
- Pii Y, Crimi M, Cremonese G, Spena A y Pandolfini T** (2007). Auxin and nitric oxide control indeterminate nodule formation. *Plant Biology* 7:21.
- Polkade VA, Mantri SS, Patwekar JU y Jangid K** (2016). Quorum sensing: An under-explored phenomenon in the phylum *Actinobacteria*. *Frontiers in Microbiology* 7:1-13.
- Ramírez-Chávez E, López-Bucio J, Herrera-Estrella L y Molina-Torres J** (2004). Alkamides isolated from plants promote growth and alter root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 134:1058-1068.
- Rangel de Souza ALS, De Souza SA, De Oliveira MVV, Ferraz TM, Figueiredo FAMMA, Da Silva ND, Rangel PL, Panisset CRS, Olivares FL, Campostrini E y De Souza Filho GA** (2015). Endophytic colonization of *Arabidopsis thaliana* by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and its effect on plant growth promotion, plant physiology, and activation of plant defense. *Plant Soil* 399:257-270.
- Rashid HM, Krehenbrink M y Akhtar SM** (2015). Nitrogen-fixing plant-microbe symbioses. *Sustainable Agriculture Reviews* 193-234.
- Rudrappa T, Czymmek KJ, Paré PW y Bais HP** (2008). Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant Physiology* 148:1547-1556.
- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Wei HX, Paré PW y Kloepper JW** (2003). Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Science* 100:4927-4932.
- Ryu MC, Farag AM, Hu HC, Reddy SM, Kloepper WJ y Paré WP** (2004). Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 134:1017-1026.
- Saini S, Sharma I, Kaur N y Pati KP** (2013). Auxin: a master regulator in plant root development. *Plant Cell Reports* 32:741-757.

- Sánchez-Calderón L, López-Bucio J, Chacón-López A, Cruz-Ramírez A, Nieto-Jacobo F, Dubrovsky GJ y Herrera-Estrella L** (2005). Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* 46:174-184.
- Santos CL, Correia-Neves M, Moradas-Ferreira P, Mendes MV** (2012). A walk into the LuxR regulators of Actinobacteria: Phylogenomic distribution and functional diversity. *PLoS ONE* 7:1-15.
- Satbhai BS, Ristova D y Busch W** (2015). Underground tuning: quantitative regulation of root growth. *Journal of Experimental Botany* 66:1099-1112.
- Schaller EG** (2012). Ethylene and the regulation of plant development. *BMC Biology* 10:1-3.
- Schwartz RA, Ortíz I, Maymon M, Herbold WC, Fujishige AN, Vijanderan AJ, Villella W, Hanamoto K, Diener A, Sanders RE, DeMason AD y Hirsch MA** (2013). *Bacillus simplex*-A little known PGPB with anti-fungal activity-alters pea legume root architecture and nodule morphology when coinoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Agronomy* 3:595-620.
- Shishkova S, Rost TL y Dubrovsky J** (2008). Determinate root growth and meristem maintenance in angiosperms. *Annals of Botany* 101:319-340.
- Silveira N, Saar J, Santo CDA, Barison A, Sandjo PL, Kaiser M, Schmit JT y Biavatti WM** (2016). A new alkamide with an endoperoxide structure from *Acmella ciliata* (Asteraceae) and its *in vitro* antiplasmodial activity. *Molecules* 21:765.
- Smith S y De Smet I** (2012). Root system architecture: insight from *Arabidopsis* and cereal crops. *Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 367:1441-1452.
- Somers E, Ptacek D, Gysegom P, Srinivasan M y Vanderleyden J** (2005). *Azospirillum brasilense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:1803-1810.
- Song GC y Ryu CM** (2013). Two volatile organic compounds trigger plant self-defense against a bacterial pathogen and a sucking insect in cucumber under open field conditions. *International Journal of Molecular Sciences* 14:9803-9819.
- Spaepen S** (2008). Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant Soil* 312:15-23.

- Spaepen S, Bossuyt S, Engelen K, Marchal K y Vanderleyden J** (2014). Phenotypical and molecular responses of *Arabidopsis thaliana* roots as a result of inoculation with the auxin-producing bacterium *Azospirillum brasilense*. *New Phytologist* 201:850-861.
- Spaepen S y Vanderleyden** (2011). Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3:1-13.
- Spaepen S., Vanderleyden J. y Remans R.** (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *Federation of European Microbiological Societies* 31:425-448.
- Su HY, Liu BY y Zhang SX** (2011). Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular Plant* 4:616-625.
- Schwartz AR, Ortiz I, Maymon M, Herbold CW, Fujishige NA, Vijanderan JA, Villella W, Hanamoto K, Diener A, Sanders ER, DeMason DA y Hirsch AM** (2013). *Bacillus simplex*-A little PGPB with anti-fungal activity-alters pea legume root architecture and nodule morphology when coinoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Agronomy* 3:595-620.
- Taiz L y Zeiger E** (2002). *Plant Physiology*. 3rd. Ed. 442 pp.
- Teaster DN, Motes MC, Tang Y, Wiant CW, Cotter QM, Wang SY Kilaru A, Venables JB, Hasenstein HK, González G, Blancaflor BE y Chapman DK** (2007). N-acylethanolamine metabolism interacts with abscisic acid signaling in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell* 19:2454-2469.
- Theunis M, Kobayashi H, Broughton JW y Prinsen E** (2004). Flavonoids, NodD1, NodD2, and *Nod*-Box NB15 modulate expression of the *y4wEFG* locus that is required for indole-3-acetic acid synthesis in *Rhizobium* sp. Strain NGR234. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17:1153-1161.
- Tian H, De Smet I y Ding Z** (2014). Shaping a root system: regulating lateral versus primary root growth. *Trends in Plant Science* 1-6.
- Tian Q, Uhler JN y Reed WJ** (2002). *Arabidopsis* SHY2/IAA3 inhibits auxin-regulated gene expression. *The Plant Cell* 14:301-319.
- Trujillo ME, Riesco R, Benito P y Carro L** (2015). Endophytic actinobacteria and the interaction of *Micromonospora* and nitrogen fixing plants. *Frontiers in Microbiology* 6:1-15.
- Ueda N, Tsuboi K y Uyama T** (2013). Metabolism of endocannabinoids and related N-acylethanolamines: canonical and alternative pathways. *Federation of European Biochemical Societies Journal* 280:1874-1894.

- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G y Guilfoyle T** (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9:1963-1971.
- Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud ML, Touraine B, Loccoz YM, Muller D, Legendre L, Dyé FW y Combaret CP** (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science* 4:1-19.
- Vanneste S, De Rybel B, Beemster GTS, Kjung K, De Smet I, Isterdael GV, Naudts M, Lida R, Gruissem W, Tasaka M, Inzé D, Fukaki H y Beeckman T** (2005). Cell cycle progression in the pericycle is not sufficient for SOLITARY ROOT/IAA14-mediated lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 17:3035-3050.
- Vanneste S y Friml J** (2009). Auxin: A trigger for change in plant development. *Cell* 136:1005-1016.
- Vanneste S y Friml J** (2013). Calcium: The missing link in auxin action. *Plants* 2: 650-675.
- Von Rad U, Klein I, Dobrev PI, Kottova J, Zazimalova E, Fekete A, Hartmann A, Schmitt-Kopplin P y Durner J** (2008). Response of *Arabidopsis thaliana* to N-hexanoyl-DL-homoserine-lactone, a bacterial quorum sensing molecule produced in the rizosphere. *Planta* 229:73-85.
- Yadav KB, Akhtar SM y Panwar J** (2015). Rhizospheric plant-microbe interactions: key factors to soil fertility and plant nutrition. *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets* 127-145.
- Yanni YG, Rizk RY, Abd El-Fattah FK, Squartini A, Corich V, Giacomini A, De Brujin F, Rademaker J, Maya-Flores J, Ostrom P, Vega-Hernández M, Hollingsworth RI, Martínez-Molina E, Mateos P, Velázquez E, Wopereis J, Triplett E, Umali-Garcia M, Anarna JA, Rolfe BG, Ladha JK, Hill J, Mujoo R, NG PK, Dazzo FB** (2001). The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* by trifolii with rice. *Australian Journal of Plant Physiology* 28:845-870.
- Walling LL** (2001). Adaptative defense responses to pathogens and insects. *Advances in Botanical Research: Plant innate immunity*, Loon,L.C.V., ed. (London Academic Press). 51:551-612.
- Wang B, Chu J, Yu T, Xu Q, Sun X, Yuan J, Xiong G, Wang G, Wang Y y Li J** (2015). Tryptophan-independent auxin biosynthesis contributes to early embryogenesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Science* 112:4821-4826.

- Wang R y Estelle M** (2014). Diversity and specificity: auxin perception and signaling through the TIR1/AFB pathway. *Current Opinion in Plant Biology* 21:51-58.
- Wang W, Qiu Z, Tan H y Cao L** (2014). Siderophore production by actinobacteria. *Biometals* 1-9.
- Wang YS, Shrestha R, Kilaru A, Wiant W, Venables BJ, Chapman KD y Blancaflor EB** (2006). Manipulation of *Arabidopsis* fatty acid amide hydrolase expression modifies plant growth and sensitivity to N-acyl ethanolamines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:12197-12202.
- Waters MC y Bassler LB** (2005). Quorum Sensing: A cell-to cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell Developmental Biology* 21:19-46.
- Waters MC y Bassler LB** (2006). Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* 24:1113-1116.
- Westfall SC, Herrmann J, Chen Q, Wang S y Jez MJ** (2010). Modulating plant hormones by enzyme action. *Plant Signaling & Behavior* 5:1607-1612.
- Whipps MJ** (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52:487-511.
- Zhao Y** (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual Review of Plant Biology* 61: 49-64.

10. ADENDA

En esta sección se presentan las publicaciones en colaboración con el grupo de trabajo durante el desarrollo del proyecto de tesis.

I. Artículos con arbitraje internacional

1. Barrera-Ortiz S, Garnica-Vergara A, Esparza-Reynoso S, **García-Cárdenas E**, Raya-González J, Ruiz-Herrera L.F, López-Bucio J (2017) Jasmonic acid reprograms *Arabidopsis* root system architecture through nitric oxide accumulation and *ETHYLENE INSENSITIVE 2* signaling. Journal of Plant Growth Regulation.



**Jasmonic acid-ethylene crosstalk via ETHYLENE
INSENSITIVE 2 reprogrammes Arabidopsis root system
architecture through nitric oxide accumulation.**

Journal:	<i>Journal of Plant Growth Regulation</i>
Manuscript ID	JPGR-17-0244.R1
Manuscript Type:	Original Manuscripts
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Barrera-Ortiz, Salvador; Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, Instituto de investigaciones Químico Biologicas Garnica-Vergara, Amira; Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas Esparza-Reynoso, Saraí; Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas García-Cárdenas, Elizabeth; Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas Raya-Gonzalez, Javier; Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas Ruiz-Herrera, León; Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas López-Bucio, José; Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas
Keywords:	Arabidopsis, Jasmonic acid, Nitric oxide, Root development, Phytohormones

SCHOLARONE™
Manuscripts

03-Aug-2017

Prof. Jutta Ludwig-Müller

Editor in Chief

Journal of Plant Growth Regulation

Dear Prof. Ludwig-Müller:

Please find enclosed a revised version of manuscript (JPGR-17-0244) entitled “Jasmonic acid-ethylene crosstalk via *ETHYLENE INSENSITIVE 2* reprogrammes *Arabidopsis* root system architecture through nitric oxide accumulation”. The former title was “Jasmonic acid reprograms *Arabidopsis* root system architecture through nitric oxide accumulation and *ETHYLENE INSENSITIVE 2* signaling”, which was changed following recommendation by the Editor and the Reviewers.

Please note that minor changes were applied to figures 6, 7 and S2 according to the suggestion of Reviewer 1, who pointed out that it is better to use “Inhibition of primary root length by JA (percentage)” and “Promotion of lateral root density by JA (percentage)” to gain better comparison between wild type and the mutants in response to JA or other chemicals treatments.

The changes to the manuscript can be appreciated in colored text.

I take this opportunity for acknowledge the time and effort of the editors and the reviewers for the kind comments and suggestions that helped us to improve the manuscript. Hopefully, this revised version is now acceptable.

Sincerely,

José López Bucio

Reviewing Editor's Comments to Author:

Reviewing Editor

Comments to the Author:

The manuscript (ID JPRG-17-0244) has now been seen by the two reviewers who saw the first version of the paper. As you can see from the reviews attached, their comments are quite positive and no more experiments are requested.

However, still some concerns remain (including change of the title, which I strongly support) that should be addressed in a new version for a better understanding of the study.

In a revised version the comments made by the reviewers must be carefully addressed using the track change feature.

Reviewer(s)' Comments to Author:

Reviewer: 1

Comments to the Author

I reviewed the previous version of the manuscript before and raised some points regarding the conclusions derived from the study and the presented manner of the data. Although the authors made great changes in the revised version, they did not completely address the problems I concerned. Some comments on the current version are described in the following.

1. I pointed out that it is better to use “Inhibition of primary root length by JA (percentage)” and “Promotion of lateral root density by JA (percentage)” to gain better comparison between wild type and the mutants in response to JA or other chemicals treatments. However, the authors did not solve the problem in Figures 6~7, especially, in supplemental Fig. S2. Thus, they may come up with inaccurate conclusions.

We agree with the reviewer, thus minor changes were applied to figures 6, 7 and S2 according to the suggestion of use “Inhibition of primary root length by JA (percentage)” and “Promotion of lateral root density by JA (percentage)”.

2. The figure legends in Figures 6~7 did not match the data. For example, Fig. 6a depicts the inhibition of primary root length by JA, rather than primary root length

We have updated the legends of Figs. 6, 7 and S2, according to the changes made and taking into account this suggestion.

3. In Fig. 7, the double mutant *ein2-1jar1-1* showed phenotypic responses similar to *ein2-1* mutant under SNP treatment, which suggests that EIN2 may act in the downstream of JAR1-mediated signaling in response to NO effect. Thus, the

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

authors should emphasize this regulation, leading to the conclusion in the title that the authors proposed.

We agree with this recommendation and changed the title as follows: “Jasmonic acid-ethylene crosstalk via *ETHYLENE INSENSITIVE 2* reprogrammes *Arabidopsis* root system architecture through nitric oxide accumulation”. The former title was “Jasmonic acid reprograms *Arabidopsis* root system architecture through nitric oxide accumulation and *ETHYLENE INSENSITIVE 2* signaling”, which was changed following recommendation by the Editor and the Reviewers.

Reviewer: 2

Comments to the Author

The revised version of the document had added considerable data to strengthen the work. However the title is rather misleading. Authors highlight only JA part and not its crosstalk to with ethylene as clearly mentioned in discussion (457-464). I would modify the title as "JA-ethylene crosstalk via EIN2 reprogrammes *Arabidopsis* root system architecture through NO accumulation".

We appreciate the new title suggested by this reviewer, which was taken into account for the current title of the manuscript: “Jasmonic acid-ethylene crosstalk via *ETHYLENE INSENSITIVE 2* reprogrammes *Arabidopsis* root system architecture through nitric oxide accumulation”.

Jasmonic acid and nitric oxide in root development

Full title: Jasmonic acid-ethylene crosstalk via *ETHYLENE INSENSITIVE 2* reprogrammes *Arabidopsis* root system architecture through nitric oxide accumulation.

Full name of authors: Salvador Barrera-Ortiz, Amira Garnica-Vergara, Saraf Esparza-Reynoso, Elizabeth García-Cárdenas, Javier Raya-González, León Francisco Ruiz-Herrera, José López-Bucio.
Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio B3, Ciudad Universitaria. C. P. 58030, Morelia, Michoacán, México.

Author to whom correspondence should be addressed:

Name: José López-Bucio.

Address: Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio B3, Ciudad Universitaria. C. P. 58030, Morelia, Michoacán, México.

Telephone: 52 (443) 3265788, **Fax:** 52 (443) 3265788; **e-mail:** jlbucio@umich.mx.

To: Journal of Plant Growth Regulation

Section: Full paper

Abstract

Plant growth and development are tightly regulated by phytohormones, including jasmonic acid (JA) and ethylene (ET), two canonical players in plant defense and in the control of root system architecture. Here, we show that JA inhibits primary root growth and promotes lateral root development while inducing nitric oxide (NO) accumulation in the wild-type (WT) primary root, but not in *jar1-1*, *coi1-1*, *myc2-1* and *myc2-2* *Arabidopsis* mutants defective in JA biosynthesis or response. NO-related mutants *nia1/nia2* and *Atnoa1* were indistinguishable in root architectural responses to JA when compared to WT seedlings and the developmental changes were apparently unrelated to reactive oxygen species (ROS) accumulation. Root growth inhibition by NO-donor sodium nitroprusside (SNP) was reduced in *coi1-1* mutants and NO accumulation induced the expression of the downstream repressors *JAZ1* and *JAZ10* at the differentiation and/or meristematic root regions. Comparison of growth of WT, *ein2-1*, *jar1-1* and *ein2-1/jar1-1* mutants further revealed a critical role of *ETHYLENE INSENSITIVE2* (*EIN2*) in mediating both JA-and NO root sensing. Our results suggest that NO mediates JA signaling during the configuration of the *Arabidopsis* root system architecture and that *EIN2* plays a role in this developmental program.

keywords: *Arabidopsis*, jasmonic acid, nitric oxide, root development, phytohormones.

Introduction

The fatty acid-derived plant hormone jasmonic acid regulates physiological and phenotypic plasticity as well as environmental adaptation. Besides being an inducer of plant defense, JA plays a key role in the configuration of the root system by inhibiting primary root growth and promoting lateral root formation (Staswick and others 1992; Chen and others 2011; Raya-González and others 2012).

Several molecular components are involved in JA-induced root architectural reprogramming. JA reduces root growth affecting both cell elongation and meristem activity, and represses the AP2-domain transcription factors PLETHORA1 (PLT1) and PLT2. This process requires the functioning of MYC2/JASMONATE INSENSITIVE1, a basic helix loop-helix transcription factor (Chen and others 2011; Gasperini and others 2015). In addition, the *Arabidopsis* F-box protein CORONATINE INSENSITIVE1 (COI1), which forms a functional E3 ubiquitin ligase SCF^{COI1} and acts as a JA receptor, plays a role in JA-induced lateral root formation (Xu and others 2002; Raya-González and others 2012).

The JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ) proteins interact with TOPLESS (TPL) and NOVEL INTERACTOR OF JAZ (NINJA) to form a repressor complex that inhibits MYC2 activity in the absence of JA (Chini and others 2007; Thines and others 2007; Pauwels and others 2010). However, when the levels of JA increase and upon binding to it, COI1 targets the JAZ repressors for proteolytic degradation, allowing JA-responsive transcriptional activation (Thines and others 2007; Pauwels and others 2010). Regarding what is known on shoots, little is known about the cellular organization and regulation of the JAZ and other JA signaling components in roots.

Jasmonic acid and ethylene regulate a common set of plant responses to biotic stimuli and are frequently found to act in parallel. Both phytohormones are required for plant resistance to necrotrophic pathogens and defense related gene expression (Xu and others 1994; Penninckx and others 1998; Lorenzo and others 2003), while acting as negative players in mutualistic plant-fungus symbiosis (Plett and others 2014). In roots, ethylene may also inhibit cell

proliferating activity of meristems, since *CULLIN3* genes regulate cell division through the canonical ethylene signal transduction pathway that incorporates CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1, ETHYLENE INSENSITIVE2, and ETHYLENE INSENSITIVE3 as well as a phosphorelay pathway based on receptor histidine kinases and the type B cytokinin response regulators (Thomann and others 2009; Street and others 2015).

Some secondary metabolites, such as the plant alkamides, influence JA homeostasis. The alkamides are fatty acid amides naturally present in many plant families, and are structurally related to *N*-acyl-*L*-homoserine lactones (AHLs) from Gram-negative bacteria and to *N*-acylethanolamines (NAEs) from plants and mammals (Ramírez-Chávez and others 2004; Ortiz-Castro and others 2008; Blancaflor and others 2014; Greger 2016). Global analysis of gene expression in *Arabidopsis* seedlings in response to the strongly active alkamide *N*-isobutyl decanamide, revealed an overrepresentation of genes encoding enzymes for JA biosynthesis, which occurred in parallel with JA and NO accumulation, indicating the possible link between these two plant signals (Méndez-Bravo and others 2011).

Nitric oxide (NO) is a free radical present in most plant organs, where it controls a wide range of environmental and physiological functions acting as a cellular messenger (Wendehenne and Hancock 2011). In *Arabidopsis* roots, NO reduces cell division and elongation (Fernández-Marcos and others 2012), and activates lateral root formation (Campos-Cuevas and others 2008; Méndez-Bravo and others 2010; Schlicht and others 2013). The precise role of NO and downstream targets in regulating the configuration of the root system and its relationship with jasmonic acid and ethylene signaling still awaits clarification. Therefore, a major current goal is to uncover new genetic elements integrating the hormonal plant response to NO sensing.

Here, we report that JA induces NO production in *Arabidopsis* primary roots in a *JAR1*, *COI1*, and *MYC2*-dependent manner, and activates *JAZ1* and *JAZ10* as downstream targets during root architecture configuration. Moreover, we identify *ETHYLENE INSENSITIVE2* as an important player in JA-induced primary root growth and NO accumulation. Our results suggest that NO mediates [JA-ET crosstalk via EIN2](#) and that this interaction is important for root morphogenesis.

132

133 Materials and methods

134

135 Plant material and growth conditions

136

137 *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia (Col-0), and mutant lines *coi1-1* (Feys
138 and others 1994), *jar1-1* (Staswick and others 1992), *myc2-1* (SALK_061267),
139 *myc2-2* (SALK_017005), *ein2-1* (Guzmán and Ecker 1990), *rcd1*
140 (SALK_116432), *nia1/nia2* (Wilkinson and Crawford 1993) and *Atnoa1* (Guo
141 and others 2003) were used for the different experiments. Generation of
142 *Arabidopsis ein2 jar1* double mutants was done by outcrossing *ein2-1* single
143 mutants with *jar1-1* pollen to obtain the F1 progeny and the corresponding
144 plants were allowed to self-fertilize to recover the F2 generation. Homozigous
145 *ein2 jar1* seedlings were identified upon the primary root resistance to both
146 jasmonic acid and ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid
147 (ACC) in primary root growth assays, and were propagated for at least three
148 generations. *Arabidopsis* transgenic seedlings included *JAZ1/TIFY10A-GFP*
149 (Grunewald and others 2009) and *JAZ10-GFP* (Pilliteri and others 2011).

150 Seeds were surface sterilized with 95 % (v/v) ethanol for 4 min and 10% (v/v)
151 bleach for 4 min. After five washes in distilled water, seeds were germinated
152 and grown on agar plates containing 0.2X MS medium. The MS medium
153 (Murashige and Skoog Basal Salts Mixture, catalogue no. M5524) was
154 purchased from Sigma. Plates were placed vertically at an angle of 65° to allow
155 root growth along the agar surface and to allow unimpeded aerial growth of the
156 hypocotyls. Plants were placed in a plant growth chamber (Percival AR-95 L)
157 with a photoperiod of 16 h of light/8 h darkness, light intensity of 300 μ mol and
158 temperature of 22 °C.

159

160 Selection of *Arabidopsis coi1-1* homozigous seedlings

161

162 For transfer experiments of WT and *coi1-1* seedlings, seeds were first sterilized
163 and germinated on 0.2X MS medium as described above. For *coi1-1* mutant
164 selection, 300 seeds from a *coi1-1/CO1* segregating population were screened

for sustained primary root growth in agar solidified MS 0.2X medium supplemented with 4 μ M JA by placing seeds on 100 cm² nutrient agar plates (20 seeds per plate). The seeds were distributed in two rows on the agar surface at a density of 1 seed/cm, stratified at 4 °C for 48 h, and then incubated at 22 °C. Putative JA-resistant mutants with long roots were selected and transferred to plates with the different treatments.

Analysis of growth

Arabidopsis root system was analyzed with a stereoscopic microscope (Leica, MZ6). All lateral roots emerged from the parent root were observed and registered with the 3X objective. Primary root length was determined for each root using a ruler. Lateral root density was determined by dividing the lateral root number value by the primary root length for each seedling. For all experiments, the data were statistically analyzed using STATISTICA 10.0 program (Dell StatSoft, Austin, Texas, USA). Univariate and multivariate analyses with Tukey's post hoc test were used for testing differences in growth and root development responses. Different letters were used to indicate means that differ significantly ($p < 0.05$).

Confocal microscopy

NO was monitored by incubating *Arabidopsis* seedlings with 10 μ M of the fluorescent probe DAF-2DA in 1 M Tris-HCl (pH 7.4). Living cells incorporate DAF-2DA, which subsequently is hydrolyzed by cytosolic esterases to release 4,5-diaminofluorescein (DAF-2), which reacts with NO to produce the fluorescent triazole derivate triazolofluorescein (DAF-2T). General ROS were visualized with 10 μ M of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H2DCF-DA) a cell-permeable non-fluorescent probe that is de-esterified intracellularly and turns to highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein upon oxidation. JAZ1/TIFY10A-GFP and JAZ10-GFP seedlings were incubated with each fluorophore for 1 h in darkness, and washed three times for 20 min with fresh buffer. Fluorescence signals were detected using a confocal laser scanning microscope (Olympus

FV1200), and monitored with an argon blue laser with an excitation line from 488 to 568 nm and an emission window from 585 to 610 nm. Micrographs acquired with the confocal microscope were analyzed in ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). For each treatment and line, fluorescence intensity was registered from 6 micrographs. Fluorescence intensity was quantified by determining green pixels in a defined area. An arbitrary unit value was obtained (AU= pixels μm^2) for each micrograph, and means were obtained from whole data sets.

Results

Jasmonic acid induces nitric oxide accumulation in *Arabidopsis* roots

As a first step to investigate the possible involvement of NO underlying JA regulation of root growth, we analyzed *in situ* levels and localization of NO by using the fluorescent probe 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2DA) in seedlings grown in medium supplemented with increasing concentrations of JA. As expected, JA modified *Arabidopsis* root system architecture, by inhibiting primary root growth and increasing lateral root density (number of lateral roots (LR)/cm) in a dose dependent manner (Fig. 1a, b). The greatest JA concentration tested (8 μM) repressed root growth by 80%, whereas LR density was stimulated up to seven times respect to control conditions.

When primary roots of WT seedlings grown in medium lacking JA were loaded with DAF-2DA and analyzed by confocal microscope, NO was detected in several tissues and structures, including epidermal cells, root hairs, root elongation zone, root cap, and the quiescent center (QC) (Fig. 1c). Interestingly, the inhibition of root growth and enhanced LR formation in response to JA tightly correlated with the increased NO fluorescence in all these regions, and particularly at the primary root meristem (Fig. 1c). These data show that NO accumulates in *Arabidopsis* roots following JA application.

JA biosynthesis and signaling components mediate JA-induced root-growth inhibition and nitric oxide accumulation in primary roots

230

231 Several molecular components involved in JA-biosynthesis and response play a

232 role in root architecture reprogramming (Chen and others 2011; Raya-González

233 and others 2012). To evaluate at the genetic level the possible interaction

234 between JA and NO on root system architecture, we tested root growth

235 responses and changes in NO levels of *Arabidopsis* WT seedlings grown side

236 by side with *jar1-1* or *myc2-1* and *myc2-2* in media with or without JA.

237 Supplementation of 1 and 4 μ M JA to WT seedlings showed inhibition of

238 primary root growth that was reduced in *jar1-1* or in two *myc2* mutant lines

239 defective on two independent alleles (Figs. 2a and 3a). Besides to primary root

240 growth, *jar1-1*, *myc2-1* and *myc2-2* mutants showed insensitivity to JA effects in

241 promoting LR formation (Fig. 2b, and 3b), indicating that JA requires an intact

242 mechanism via JAR1 and MYC2 to modify root system architecture.

243 Accordingly, JA could induce NO production in WT primary root tissues, but not

244 in *jar1* or *myc2* mutants (Figs. 2c and 3c).

245 In another set of experiments, WT and homozygous *coi1-1* mutants were

246 compared for primary root growth repression in medium supplemented with 4

247 μ M JA. The strong resistance of the mutants to JA correlated with decreased

248 levels of NO accumulation at the root tip (Supplementary Fig. S1). Together,

249 these data suggest that *JAR1*, *COI1* and *MYC2* are required for NO production

250 in primary roots in response to JA.

251

252 **Jasmonic acid-induced changes in root growth occur independently of**

253 ***NIA1*, *NIA2* and *AtNOA1***

254

255 NO levels in *Arabidopsis* are controlled by the activity of two nitrate reductases,

256 encoded by the *NIA1* and *NIA2* genes, and the *NITRIC OXIDE ASSOCIATED1*

257 (*AtNOA1*; Rockel and others 2002; Sudhamsu and others 2008). Given that JA

258 modulates root development by inducing NO accumulation, we evaluated JA

259 effects on *nia1/nia2*, and *Atnoa1* double and single mutants, respectively. Since

260 *nia1/nia2* and *Atnoa1* mutants develop shorter primary roots with lesser lateral

261 roots than WT seedlings in medium lacking JA, the growth repression and

262 lateral root density was calculated as percentage. In response to JA treatment,

WT, *nia1/nia2* and *Atnoa1* seedlings were indistinguishable regarding primary root growth inhibition or lateral root density (Supplementary Fig. S2), suggesting that JA regulated root architecture re-configuration operates independently of the *NIA1*, *NIA2* and *AtNOA1*.

Nitric oxide modulates JAZ1 and JAZ10 protein levels in roots

The JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ) proteins are induced by JA and act as downstream repressors of its own signaling pathway (Chini and others 2007; Thines and others 2007; Pauwels and others 2010). To test the role of nitric oxide in regulating JAZ proteins in roots, we compared the expression pattern of *JAZ1/TIFY10A-GFP* (Grunewald and others 2009) and *JAZ10-GFP* (Chung and Howe 2009) in response to increasing concentrations of the NO donor SNP. In agreement with previous results (Grunewald and others 2009), *JAZ1/TIFY10A-GFP* was localized in the nucleus of the vascular cylinder as discrete speckles or nuclear bodies (Supplementary Fig. S3). NO clearly increased the number of cells with nuclear bodies expressing the construct in the vascular cylinder and cortex at the differentiation zone of the root, but not in primary root tips (Supplementary Fig. S3). On the other hand, the analysis of *JAZ10-GFP* expression clearly indicated its induction in lateral root primordia and the protoxylem of primary root tips by NO (Fig. 4). Since *JAZ1* is inducible by JA (Grunewald and others 2009), the current data are consistent with a role of NO as mediator in the JA signaling pathway.

The loss of *COI1* function decreases nitric oxide accumulation and response in roots

If NO acts as a modulator of JA signaling, then we hypothesized that *Arabidopsis* mutants that are JA-resistant would also be resistant to NO in root growth and lateral root formation. To test this possibility, the primary root growth and root branching responses of WT and *coi1-1* mutants were compared in medium with or without SNP. Supplementation of 20 μ M SNP repressed root growth while increasing lateral root density in WT plants, which correlated with

296 NO-fluorescence in primary root tips, and this response was reduced in *coi1-1*
297 mutants (Fig. 5a-c). Thus, the NO response of *Arabidopsis* roots requires the JA
298 receptor COI1.

299

300 ***ETHYLENE INSENSITIVE2* plays a role in jasmonic acid-induced primary-**
301 **root growth and nitric oxide accumulation and sensitivity**

302

303 Jasmonic acid and ethylene regulate a common set of plant responses to biotic
304 stimuli and act in parallel to modulate gene expression (Lorenzo and others
305 2003; Plett and others 2014). Therefore, it could be possible that genetic
306 elements of the ethylene signal transduction could be responsible for JA-
307 induced repression of root growth. One of the most ethylene insensitive mutants
308 identified to date is defective at *ETHYLENE INSENSITIVE2* (*EIN2*; Guzmán
309 and Ecker 1990).

310 To determine possible synergic effects in response to JA among JA-related
311 genes and ethylene signaling, comparisons of primary root growth and lateral
312 root formation of WT, *ein2-1*, *jar1-1* and *ein2-1/jar1-1* mutants were performed
313 in response to 1 and 4 μM JA, and NO detection was performed in primary root
314 tips. Interestingly, the *ein2-1* mutants were clearly resistant to the growth
315 repressing effects of JA and also in root branching promotion by this hormone,
316 and this effect further increased in *ein2-1/jar1-1* double mutants (Fig. 6a-c). JA
317 sensitivity in *ein2-1* and *jar1-1* single, and double mutant combinations
318 correlated with lower accumulation of NO in response to the JA treatments.
319 These data reveal a novel and critical role of *EIN2* in JA-mediated NO
320 accumulation in the *Arabidopsis* primary roots.

321 To test whether the strong JA-resistance of *ein2-1/jar1-1* double mutants
322 correlate with an altered NO sensitivity, the primary root growth response to
323 SNP was compared in WT, *ein2-1*, *jar1-1* and *ein2-1/jar1-1* single and double
324 mutants. The data show a strong resistance to NO accumulation and response
325 in both single and double mutants (Fig. 7a-c), implying a JA-ethylene crosstalk
326 orchestrating NO biosynthesis and response during the configuration of the
327 *Arabidopsis* root system.

328

Reactive oxygen species did not act as modulators during the JA-induced root reprogramming

Reactive oxygen species (ROS), which include the hydroxyl radical ($\text{HO}^\cdot$), superoxide ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), are continuously produced as a result of the normal aerobic metabolism of plants, the photosynthesis process and in response to different exogenous and endogenous cues (Mittler and others 2011). To investigate if ROS could be part of the mechanism of primary root inhibition by JA, we monitored ROS accumulation in root tips by using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H2DCF-DA) and confocal imaging in WT and *coi1-1* plants treated with JA, SNP and the herbicide methyl viologen (paraquat). Interestingly, *coi1-1 Arabidopsis* mutants showed higher ROS levels under standard growth conditions and no further increases were evident in either the WT or the mutant in the JA treatment (Fig. 8a, b). Paraquat increased ROS levels in WT seedlings and in *coi1-1* mutants, suggesting that its accumulation within the root tip might not determine primary root growth inhibition by JA according to the resistance to JA of *coi1-1*.

We next compared primary root growth in response to JA of WT and *radical cell death (rcd1)* mutants, which are resistant to paraquat-induced ROS accumulation in primary roots (Pelagio-Flores and others 2016). The WT and *rcd1* seedlings displayed similar sensitivity to the primary root growth inhibition caused by JA (Supplementary Fig. S4). These results suggest that the primary root growth inhibition in response to JA is not mediated by an altered ROS homeostasis.

Discussion

Jasmonic acid orchestrates plant development and adaptation to biotic challenges through its regulated biosynthesis via JAR1 and closely related enzymes. JAR1 catalyzes the conjugation of isoleucine to JA, forming the bioactive jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) molecule, which upon recognition by COI1 results in the degradation of the JAZ repressors and the subsequent activation of MYC2 dependent transcriptional responses. This signal

transduction pathway may influence the biosynthesis of other phytohormones and second messengers play important roles in hormonal crosstalk acting as modulators of gene expression (Lorenzo and others 2003; Mur and others 2008).

JA signaling has been thoroughly investigated in the shoot system, but scarce information is available about its importance for root organogenesis. Recently, it was reported that repetitive wounding of cotyledons transmits the shoot-to-root JA signal, which restricts root growth by inhibiting both cell proliferation and elongation (Gasperini and others 2015), an aspect that is mimicked either by application of nitric oxide or ethylene (Fernández-Marcos and others 2012; Street and others 2015). Indeed JA triggers NO accumulation in *Arabidopsis* under wounding stress and defense, while NO activates early JA signaling genes, indicating the existence of crosstalk between NO and JA signaling (Huang and others 2004; Xu and others 2005). The finding that JA induces NO levels in a concentration-dependent manner at the primary root tip indicates a repressing role on the activity of stem cells and/or the cell proliferation capacity, in agreement with its negative regulation of the AP2-domain transcription factors PLETHORA1 (PLT1) and PLT2 (Chen and others 2011). Gel shift and chromatin immunoprecipitation experiments revealed that MYC2 directly binds to the promoters of *PLT1* and *PLT2* and represses their expression (Chen and others 2011), which explains its critical role in root meristem activity and stem cell niche maintenance.

Whole-genome transcriptional profiling of *Arabidopsis thaliana* seedlings in response to *N*-isobutyl decanamide, a metabolite that improves root branching and defense responses increasing JA levels, revealed the induction of both JA-responsive and senescence-associated genes, and nitric oxide accumulation in roots and in leaves, and such responses were absent in the *coi1-1* mutants defective on the JA receptor (Méndez-Bravo and others 2011). Our current data extend these observations by showing that JA biosynthesis and signaling components including JAR1, COI1 and MYC2 mediate NO accumulation in primary roots in response to JA. In this regard, NO-related mutants *nia1/nia2* and *Atnoa1* were indistinguishable in root architectural responses to JA when compared to WT seedlings. This was somewhat surprising since the activity of

Jasmonic acid and nitric oxide in root development

the nitrate reductases encoded by the *NIA1* and *NIA2* genes are an important NO source to drive plant growth and development (Park and others 2011). An alternate oxidative pathway for NO biosynthesis requiring a putative nitric oxide synthase (NOS)-like enzyme has been long proposed to act in plants. However, despite of years of research on this topic, little advancement has been achieved (Santolini and others 2017). Initial efforts to identify a plant NOS led to characterization of the *Atnoa1* mutant (Guo and others 2003), but strong evidence suggests that this protein did not function as a nitric oxide synthase but rather acts as a plastid-targeted GTPase, and that it might be required for ribosome function (Sudhamsu and others 2008). Here we show that *Atnoa1* is not involved in the root architectural response to JA, and thus additional efforts should be conducted towards identifying the genetic elements acting in NO sensing for hormonal or environmental configuration of root architecture. NO interacts with several phytohormone pathways to orchestrate plant growth and defense and in an organ and tissue specific manner. Lateral root formation plays an important role in plant branching and absorptive capacity to take up nutrients and water. A relationship of JA-mediated NO production and an improved lateral root formation can be explained due to the positive function of NO activating root pericycle cells or via promoting auxin signaling in lateral root primordia (Schlicht and others 2013), since NO donors increase auxin-dependent gene expression and NO depletion blocks Aux/IAA protein degradation (Terrile and others 2012). Moreover, TIR1 S-nitrosylation enhances TIR1-Aux/IAA interaction, facilitating Aux/IAA degradation and subsequent activation of gene expression. Nitric oxide was found to induce the expression of *JAZ1* in the vascular cylinder and cortex at the differentiation zone of the root, but not in primary root tips, and enhanced *JAZ10* expression in lateral root primordia and the protoxylem of primary root tips. Thus, *JAZ1* and *JAZ10* have different expression domains in roots. Since *JAZ1* is inducible by JA (Grunewald and others 2009), the current data are consistent with a role of NO as mediator in the JA signaling pathway likely involved in lateral root formation and/or elongation. Following the observation that the JA receptor mutant *coi1-1* was resistant to the repressing effects of NO-donor SNP in primary roots, we hypothesized that

428 mutations conferring strong resistance to JA would render plants less sensitive
429 to local accumulation of NO at the root tip. Since JA and ethylene have common
430 targets for regulation of gene expression, we compared the WT primary root
431 growth with that of *ein2-1* and *ein2-1/jar1-1* mutants in response to either JA or
432 NO-donor SNP. Interestingly, the loss of *EIN2* function renders plants resistant
433 to JA and SNP for primary root growth stoppage. This suggests that EIN2 could
434 be part of a NO sensing pathway not only because it mediates ethylene
435 responsiveness in roots, but also because recent data demonstrated that NO
436 coordinates responses throughout development based on targeted degradation
437 of ethylene response factors (ERFs), which act as plant-specific transcriptional
438 regulators (Gibbs and others 2014). Moreover, NO itself has been reported to
439 induce ethylene production during the so called hypersensitive response, which
440 allows the plant to resist pathogen attack (Mur and others 2008).

441 In plants, both NO and reactive oxygen species (ROS) signaling occur through
442 complex mechanisms and hormone response crosstalk with salicylic acid,
443 jasmonic acid and ethylene (Mittler and others 2011). Recently, the onset of
444 nitrite-induced cell death was correlated with NO and H₂O₂ signaling and the
445 decrease in the cellular level of antioxidants (Kasten and others 2016). Two
446 sets of experiments indicated that ROS did not act as modulators during the JA-
447 induced root reprogramming. First, paraquat-induced ROS accumulation in WT
448 seedlings proceeds normally in *coi1* mutants, and second, *rcd1* mutants that are
449 defective on the *RADICAL-INDUCED CELL DEATH1 (RCD1)* gene, were
450 equally sensitive to the WT in JA-induced repression of root growth. *RCD1*
451 encodes an ADP-ribosyl-transferase domain-containing protein involved in
452 intracellular ROS generation by the herbicide paraquat and/or ultraviolet-B
453 irradiation (Ahlfors and others 2004; Fujibe and others 2004). Therefore,
454 although NO and ROS may have common targets in plant stress signaling, the
455 root developmental responses triggered by JA actually depend more on NO
456 accumulation linked to elements of the JA signal transduction pathway, which
457 may act in concert with ethylene via the function of *ETHYLENE INSENSITIVE2*.
458 Our findings underline the importance of NO in phytohormone signaling
459 pathways and highlight its role as a second messenger during the
460 configuration of the root system architecture.

461

462 **Acknowledgments**

463

464 This work was supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y
465 Tecnología (CONACYT, México, grant no. 177775) and the Consejo de la
466 Investigación Científica (UMSNH, México, grant no. CIC 2.26). Salvador
467 Barrera-Ortiz and Amira Garnica-Vergara are indebted to CONACYT for a
468 doctoral fellowship, and Saraí Esparza-Reynoso and Elizabeth García-
469 Cárdenas are indebted to CONACYT for masters scholarships. Kind donation of
470 *Arabidopsis* lines by Drs. Keiko Torii, and Alain Goossens are appreciated.

471

472 **References**

473

- 474 **Ahlfors R, Lang S, Overmyer K, Jaspers P, Brosché M, Tauriainen A,**
475 **Kollist H, Tuominen H, Belles-Boix E, Piippo M, Inzé D, Palva ET,**
476 **Kangasjärvi J** (2004) *Arabidopsis* RADICAL-INDUCED CELL DEATH1
477 belongs to the WWE protein-protein interaction domain protein family and
478 modulates abscisic acid, ethylene, and methyl jasmonate responses. *Plant Cell*
479 16:1925-1937.
- 480 **Blancaflor EB, Kilaru A, Keereetaweep J, Khan BR, Faure L, Chapman KD**
481 (2014) *N*-acylethanolamines: lipid metabolites with functions in plant growth and
482 development. *Plant J* 79:568-583.
- 483 **Campos-Cuevas JC, Pelagio-Flores R, Raya-González J, Méndez-Bravo A,**
484 **Ortiz-Castro R, López-Bucio J** (2008) Tissue culture of *Arabidopsis thaliana*
485 explants reveals a stimulatory effect of alkamides on adventitious root formation
486 and nitric oxide accumulation. *Plant Sci* 174:165-173.
- 487 **Chen Q, Sun J, Zhai Q, Zhou W, Qi L, Xu L, Wang B, Chen R, Jiang H, Qi J,**
488 **Li, X, Palme K, Li C** (2011) The basic Helix-Loop-Helix transcription factor
489 MYC2 directly represses PLETHORA expression during jasmonate-mediated
490 modulation of the root stem cell niche in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23:3335-3352.
- 491 **Chini A, Fonseca S, Fernández G, Adie B, Chico JM, Lorenzo O, García-**
492 **Casado G, López-Vidriero I, Lozano FM, Ponce MR, Micol JL, Solano R**

(2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448:666-671.

Chung HS, Howe GA (2009) A critical role for the TIFY motif in repression of jasmonate signaling by a stabilized splice variant of the JASMONATE ZIM-domain protein JAZ10 in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21:131-145.

Fernández-Marcos M, Sanz L, Lewis D, Muday GK, Lorenzo O (2012) Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PIN-FORMED 1 (PIN1)-dependent acropetal auxin transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:18506-18511.

Feys BJF, Benedetti CE, Penfold CN, Turner JG (1994) *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male-sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell* 6:751-759.

Fujibe T, Saji H, Arakawa K, Yabe N, Takeuchi Y, Yamamoto KT (2004) A methyl viologen-resistant mutant of *Arabidopsis*, which is allelic to ozone-sensitive *rcd1*, is tolerant to supplemental ultraviolet-B irradiation. *Plant Physiol* 134: 275-285.

Gasparini D, Chételat A, Acosta IF, Goossens J, Pauwels L, Goossens A, Dreos R, Alfonso E, Farmer E (2015) Multilayered organization of jasmonate signalling in the regulation of root growth. *PLoS Genet* 11:e1005300.

Gibbs DL, Isa MD, Movahedi M, Lozano-Juste J, Mendiando GM, Berckhan S, Marin-de la Rosa N, Conde JV, Sousa Correia C, Pearce SP, Bassel GW, Hamali B, Talloji P, Tome DFA, Coego A, Beynon J, Alabadí D, Bachmair A, León J, Gray JE, Theodoulou FL, Holdsworth MJ (2014) Nitric oxide sensing in plants is mediated by proteolytic control of group VII ERF transcription factors *Molecular Cell* 53:369-379.

Greger H (2016) Alkamides: a critical reconsideration of a multifunctional class of unsaturated fatty acid amides. *Phytochemistry Rev* 15:729-770.

Grunewald W, Vanholme B, Pauwels L, Plovie E, Inze D, Gheysen G, Goossens A (2009) Expression of the *Arabidopsis* jasmonate signaling repressor JAZ1/TIFY10A is stimulated by auxin. *EMBO Rep* 10:923-928.

Guo FQ, Okamoto M, Crawford NM (2003) Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signalling. *Science* 302:100-103.

Jasmonic acid and nitric oxide in root development

- 526 **Guzmán P, Ecker JR** (1990) Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to
527 identify ethylene-related mutants. *Plant Cell* 2:513-523.
- 528 **Huang X, Stettmaier K, Michel C, Hutzler P, Mueller MJ, Durner J** (2004)
529 Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in
530 *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 218:938-946.
- 531 **Kasten D, Mithöfer A, Georgii E, Lang H, Durner J, Gaupels F** (2016) Nitrite
532 is the driver, phytohormones are modulators while NO and H₂O₂ act as
533 promoters of NO₂-induced cell death. *J Exp Bot* 67:6337-6349.
- 534 **Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R** (2003) ETHYLENE
535 RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate
536 pathways in plant defense. *Plant Cell* 15:165-178.
- 537 **Méndez-Bravo A, Raya-González J, Herrera-Estrella L, López-Bucio J**
538 (2010) Nitric oxide is involved in alkamide-induced lateral root development in
539 *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 51:1612-1626.
- 540 **Méndez-Bravo A, Calderón-Vázquez C, Ibarra-Laclette E, Raya-González J,**
541 **Ramírez-Chávez E, Molina-Torres J, Guevara-García A, López-Bucio J,**
542 **Herrera-Estrella L** (2011) Alkamides activate jasmonic acid biosynthesis and
543 signaling pathways and confer resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis*
544 *thaliana*. *PLoS ONE* 6:e27251.
- 545 **Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K,**
546 **Gollery M, Shulaev V, Van Breusegem F** (2011) ROS signaling: the new
547 wave? *Trends Plant Sci* 16:300-309.
- 548 **Mur LAJ, Laarhoven L, Harren FJM, Hall MA, Smith AR** (2008) Nitric oxide
549 interacts with salicylate to regulate biphasic ethylene production during the
550 hypersensitive response. *Plant Physiol.* 148:1537-1546.
- 551 **Ortiz-Castro R, Martínez-Trujillo M, López-Bucio J** (2008)
552 *N*-acyl-*L*-homoserine lactones: a class of bacterial quorum-sensing signals alter
553 post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ*
554 31:1497-1509.
- 555 **Park BS, Song JT, Seo HS** (2011) *Arabidopsis* nitrate reductase activity is
556 stimulated by the E3 SUMO ligase AtSIZ1. *Nat Commun* 2:400.
- 557 **Pauwels L, Barbero GF, Geerinck J, Tilleman S, Grunewald W, Cuéllar**
558 **Pérez A, Chico JM, vanden Bossche R, Sewell J, Gil E, García-Casado G,**

559 **Witters E, Inzé D, Long JA, De Jaeger G, Solano R, Goossens A** (2010)
560 NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature*
561 464:788-791.

562 **Pelagio-Flores R, Ruiz-Herrera LF, López-Bucio J** (2016) Serotonin
563 modulates *Arabidopsis* root growth via changes in reactive oxygen species and
564 jasmonic acid-ethylene signaling. *Physiol Plant* 158:92-105.

565 **Penninckx IA, Thomma BP, Buchala A, Métraux JP, Broekaert WF** (1998)
566 Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is
567 required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell*
568 10:2103-2113.

569 **Plett JM, Khachane A, Ouassou M, Sundberg B, Kohler A, Martin F** (2014)
570 Ethylene and jasmonic acid act as negative modulators during mutualistic
571 symbiosis between *Laccaria bicolor* and *Populus* roots. *New Phytol* 202:270-
572 286.

573 **Pillitteri LJ, Peterson KM, Horst RJ, Torii KU** (2011) Molecular profiling of
574 stomatal meristemoids reveals new component of asymmetric cell division and
575 commonalities among stem cell populations in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23:3260-
576 3275.

577 **Ramírez-Chávez E, López-Bucio J, Herrera-Estrella L, Molina-Torres J**
578 (2004) Alkamides isolated from plants promote growth and alter root
579 development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 134:1058-1068.

580 **Raya-González J, Pelagio-Flores R, López-Bucio J** (2012) The jasmonate
581 receptor COI1 plays a role in jasmonate-induced lateral root formation and
582 lateral root positioning in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol* 169:1348-1358.

583 **Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser WM** (2002) Regulation of nitric
584 oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *J Exp Bot*
585 53:103-110.

586 **Santolini J, Andre F, Jeandroz S, Wendehenne D** (2017) Nitric oxide
587 synthase in plants: Where do we stand? *Nitric Oxide* 63:30-38.

588 **Schlicht M, Ludwig-Muller J, Burbach C, Volkmann D, Baluska F** (2013)
589 Indole-3-butyric acid induces lateral root formation via peroxisome-derived
590 indole-3-acetic acid and nitric oxide. *New Phytologist* 200:473-482.

Jasmonic acid and nitric oxide in root development

- 591 **Staswick PE, Su W, Howell SH** (1992) Methyl jasmonate inhibition of root
592 growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana*
593 mutant. Proc Natl Acad Sci USA 89:6837-6840.
- 594 **Street I, Aman S, Zubo Y, Ramzan A, Wang X, Shakeel S, Kieber J,**
595 **Schaller G** (2015) Ethylene inhibits cell proliferation of the *Arabidopsis* root
596 meristem. Plant Physiol 169:338-350.
- 597 **Sudhamsu J, Lee GI, Klessig DF, Crane BR** (2008) The structure of YqeH. An
598 AtNOS1/AtNOA1 ortholog that couples GTP hydrolysis to molecular recognition.
599 J Biol Chem 283:32968-32976.
- 600 **Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He**
601 **SY, Howe GA, Browse J** (2007) JAZ repressor proteins are targets of the
602 SCF^{COI1} complex during jasmonate signalling. Nature 448:661-665.
- 603 **Thomann A, Lechner E, Hansen M, Dumbliauskas E, Parmentier Y, Kieber**
604 **J, Scheres B, Genschik P** (2009) *Arabidopsis* CULLIN3 genes regulate
605 primary root growth and patterning by ethylene-dependent and independent
606 mechanisms. PLoS Genet 5: e1000328.
- 607 **Terrile MC, París R, Calderón-Villalobos LI, Iglesias MJ, Lamattina L,**
608 **Estelle M, Casalengué CA** (2012) Nitric oxide influences auxin signaling
609 through S-nitrosylation of the *Arabidopsis* TRANSPORT INHIBITOR
610 RESPONSE 1 auxin receptor. Plant J 70:492-500.
- 611 **Wendehenne D, Hancock JT** (2011) New frontiers in nitric oxide biology in
612 plant. Plant Sci 181:507-508.
- 613 **Wilkinson JQ, Crawford NM** (1993) Identification and characterization of a
614 chlorate-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* with mutations in both nitrate
615 reductase structural genes *NIA1* and *NIA2*. Mol Gen Genet 239:289-297.
- 616 **Xu L, Liu F, Lechner E, Genschik P, Crosby WL, Ma H, Peng W, Huang D,**
617 **Xie D** (2002) The SCF(COI1) ubiquitin-ligase complexes are required for
618 jasmonate response in *Arabidopsis*. Plant Cell 14:1919-1935.
- 619 **Xu Y, Chang P, Liu D, Narasimhan ML, Raghothama KG, Hasegawa PM,**
620 **Bressan RA** (1994) Plant defense genes are synergistically induced by
621 ethylene and methyl jasmonate. Plant Cell 6:1077-1108.

622 **Xu MJ, Dong JF, Zhu MY** (2005) Nitric oxide mediates the fungal elicitor-
623 induced hypericin production of *Hypericum perforatum* cell suspension cultures
624 through a jasmonic-acid-dependent signal pathway. *Plant Physiol* 139:991-998.

627 **Figure legends**

629 **Fig. 1** Effects of JA on root architecture and nitric oxide accumulation in
630 *Arabidopsis*. Primary root length (a) and lateral root density (b) were analyzed
631 from 10-day-old WT (Col-0) seedlings germinated and grown on the indicated
632 concentrations of JA. (c) NO detection on primary root tips of seedlings loaded
633 with DAF-2DA and visualized by confocal microscope. Values shown in (a) and
634 (b) represent the mean of 30 seedlings. Different letters are used to indicate
635 means that differ significantly ($p<0.05$). The experiment was repeated three
636 times with similar results. Scale bar= 100 μ m.

638 **Fig. 2.** Root response to jasmonic acid and nitric oxide accumulation in wild-
639 type and *jar1-1* *Arabidopsis* seedlings. WT and *jar1-1* seedlings were
640 germinated and grown on agar-solidified 0.2X MS media supplied with the
641 solvent, or with 1 and 4 μ M JA for 10 days. (a) Primary root length and (b)
642 lateral root density were recorded. Values shown represent the mean $\pm$
643 standard deviation ($n= 15$). Different letters indicate statistical differences
644 following a Tukey test analysis ($p<0.05$). (c) Representative micrographs of the
645 detection of endogenous NO with 4,5-diaminofluorescein diacetate, which was
646 determined in primary roots of at least 6 seedlings of each type and each
647 growth condition mentioned above (scale bar= 100 μ m). The experiment was
648 repeated twice with similar results.

650 **Fig. 3.** Root response to jasmonic acid and nitric oxide accumulation in wild-
651 type, *myc2-1* and *myc2-2* *Arabidopsis* seedlings. WT, *myc2-1* and *myc2-2*
652 seedlings were germinated and grown on agar-solidified 0.2X MS media
653 supplied with the solvent, or with 1 and 4 μ M JA for 10 days. (a) Primary root
654 length and (b) lateral root density were recorded. Values shown represent the

Jasmonic acid and nitric oxide in root development

mean $\pm$ standard deviation ($n=15$). Different letters indicate statistical differences following a Tukey test analysis ($p<0.05$). (c) Representative micrographs of the detection of endogenous NO with 4,5-diaminofluorescein diacetate, which was determined in primary roots of at least 6 seedlings of each type and each growth condition mentioned above (scale bar= 100 μm). The experiment was repeated twice with similar results.

Fig. 4. Effect of nitric oxide donor sodium nitroprusside on *JAZ10* expression in *Arabidopsis* roots. Transgenic *Arabidopsis* seedlings harboring the *JAZ10-GFP* gene construct were germinated and grown on agar-solidified 0.2X MS media supplied with the solvent, 5, 10 and 15 μM SNP for 10 days; at least 6 seedlings were incubated with propidium iodide, and confocal micrographs of expression pattern in two zones of primary root were taken (scale bar= 100 μm). The experiment was repeated twice with similar results.

Fig. 5. Effect of nitric oxide donor sodium nitroprusside on root development and nitric oxide accumulation in wild-type and *coi1-1* seedlings. WT seeds were germinated and seedlings were grown on agar-solidified 0.2X MS media for two days, and homozygous *coi1-1* seedlings were selected from a *coi1-1/COI1* segregating population in media supplemented with 4 μM JA two days after germination, subsequently wild-type and *coi1-1* seedlings were transferred to agar-solidified 0.2X MS media supplied with the solvent or 20 μM SNP for 8 days. (a) Primary root length and (b) lateral root density. Values shown represent the mean $\pm$ standard deviation ($n=15$). Different letters indicate statistical differences following a Tukey test analysis ($p<0.05$). (c) Representative confocal micrographs of the detection of endogenous NO with 4,5-diaminofluorescein diacetate in primary roots ($n=6$) (scale bar= 100 μm). The experiment was repeated twice with similar results.

Fig. 6. Root response to jasmonic acid and nitric oxide accumulation in wild-type, *ein2-1*, *jar1-1*, and *ein2-1/jar1-1* *Arabidopsis* seedlings. WT, single and double mutant seedlings were germinated and grown on agar-solidified 0.2X MS media supplied with the solvent, 1 or 4 μM JA for 7 days. (a) Inhibition of

primary root length (percentage) and (b) Promotion of lateral root density (percentage) were recorded. Values shown represent the mean $\pm$ standard deviation (n= 30). Different letters indicate statistical differences following a Tukey test analysis ($p<0.05$). (c) Representative confocal micrographs of the detection of endogenous NO with 4,5-diaminofluorescein diacetate, which was determined in primary roots of at least 6 seedlings (scale bar= 100 μ m). The experiment was repeated twice with similar results.

Fig. 7. Effect of nitric oxide donor sodium nitroprusside on root development and nitric oxide accumulation in wild-type, *ein2-1*, *jar1-1* and *ein2-1/jar1-1* seedlings. WT, single and double mutant seedlings were germinated and grown on agar-solidified 0.2X MS media supplied with the solvent, 5, 10 and 15 μ M SNP for 7 days. (a) Inhibition of primary root length (percentage) and (b) Promotion of lateral root density (percentage) were recorded. Values shown represent the mean $\pm$ standard deviation (n= 15). Different letters indicate statistical differences of a Tukey analysis with a value at $p<0.05$. (c) Representative confocal micrographs of the detection of endogenous NO with 4,5-diaminofluorescein diacetate, which was determined in primary roots (n=6) (scale bar= 100 μ m). The experiment was repeated twice with similar results.

Fig. 8. Reactive oxygen species (ROS) accumulation in the primary root of wild-type and *coi1-1* mutant in response to jasmonic acid (JA), sodium nitroprusside (SNP) and paraquat (PRQ). Wild-type and *coi1-1* seedlings were germinated and grown on agar-solidified 0.2X MS media for two days, and homozygous *coi1-1* seedlings were selected from a *coi1-1/COI1* segregating population in media supplemented with 4 μ M JA two days after germination, subsequently wild-type and *coi1-1* seedlings were transferred to agar-solidified 0.2X MS media supplied with the solvent, 4 μ M JA, 20 μ M SNP or 0.1 μ M PRQ for 8 days. (a) Fluorescence intensity was quantified using the IMAGEJ program in micrographs of the primary roots treated with 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H2DCF-DA). Values shown represent the mean $\pm$ standard deviation (n= 6). Different letters indicate statistical differences of a Tukey analysis with a value at $p<0.05$. (b) Representative confocal micrographs of the detection of

Jasmonic acid and nitric oxide in root development

721 endogenous ROS with H₂DCF-DA mentioned above (scale bar= 100 μ m). The
722 experiment was repeated twice with similar results.

723

724 **Supplementary fig. S1.** Root response to jasmonic acid and nitric oxide
725 accumulation in wild-type and *coi1-1* seedlings. WT seedlings were germinated
726 and grown on agar-solidified 0.2X MS media for two days, and homozygous
727 *coi1-1* seedlings were selected from a *coi1-1/COI1* segregating population in
728 media supplemented with 4 μ M JA two days after germination, subsequently
729 wild-type and *coi1-1* seedlings were transferred to agar-solidified 0.2X MS
730 media supplied either with the solvent or 4 μ M JA for 8 days. (a) Primary root
731 length and (b) lateral root density were recorded. Values shown represent the
732 mean $\pm$ standard deviation (n= 15). Different letters indicate statistical
733 differences following a Tukey test analysis ($p < 0.05$). (c) Representative
734 micrographs of the detection of endogenous NO with 4,5-diaminofluorescein
735 diacetate, which was determined in primary roots of at least 6 seedlings of each
736 type and each growth condition mentioned above (scale bar= 100 μ m). The
737 experiment was repeated twice with similar results.

738

739 **Supplementary fig. S2.** Effect of jasmonic acid on root development in wild-
740 type, *nia1/nia2* and *Atnoa1* seedlings. WT, *nia1/nia2* and *Atnoa1* seeds were
741 germinated and seedlings were grown on agar-solidified 0.2X MS media
742 supplied with the solvent, 1 and 4 μ M JA for 10 days. (a) **Inhibition of primary**
743 **root length (percentage)** and (b) **Promotion of lateral root density (percentage)**.
744 Values shown represent the mean $\pm$ standard deviation (n= 15). Different letters
745 indicate statistical differences from a Tukey test analysis with a value at $p < 0.05$.
746 (c) Representative images of the conditions in which all seedlings were grown
747 (scale bar= 1 cm). Note the different sizes of Col-0, *nia1/nia2* and *Atnoa1* in the
748 control (solvent supplied) condition. The experiment was repeated twice with
749 similar results.

750

751 **Supplementary fig. S3.** Effect of nitric oxide donor sodium nitroprusside on
752 *JAZ1* expression in *Arabidopsis* roots. Transgenic *Arabidopsis* seedlings
753 harboring the *JAZ1/TIFY10A-GFP* construct were germinated and grown on

754 agar-solidified 0.2X MS media supplied with the solvent, 5, 10 and 15 μM SNP
755 for 10 days. The seedlings were incubated with propidium iodide, and confocal
756 micrographs of the expression pattern were recorded in two zones of the
757 primary root (scale bar= 100 μm). The experiment was repeated twice with
758 similar results.

759
760 **Supplementary fig. S4.** Root response of wild-type and *rcd1* seedlings to
761 jasmonic acid. Wild-type and *rcd1* seedlings were germinated and grown on
762 agar-solidified 0.2X MS media supplied with the solvent, 1 and 4 μM JA for 10
763 days. (a) Primary root length and (b) lateral root density were recorded. Values
764 shown represent the mean $\pm$ standard deviation (n= 15). Different letters
765 indicate statistical differences from a Tukey test analysis ($p<0.05$). The
766 experiment was repeated twice with similar results.

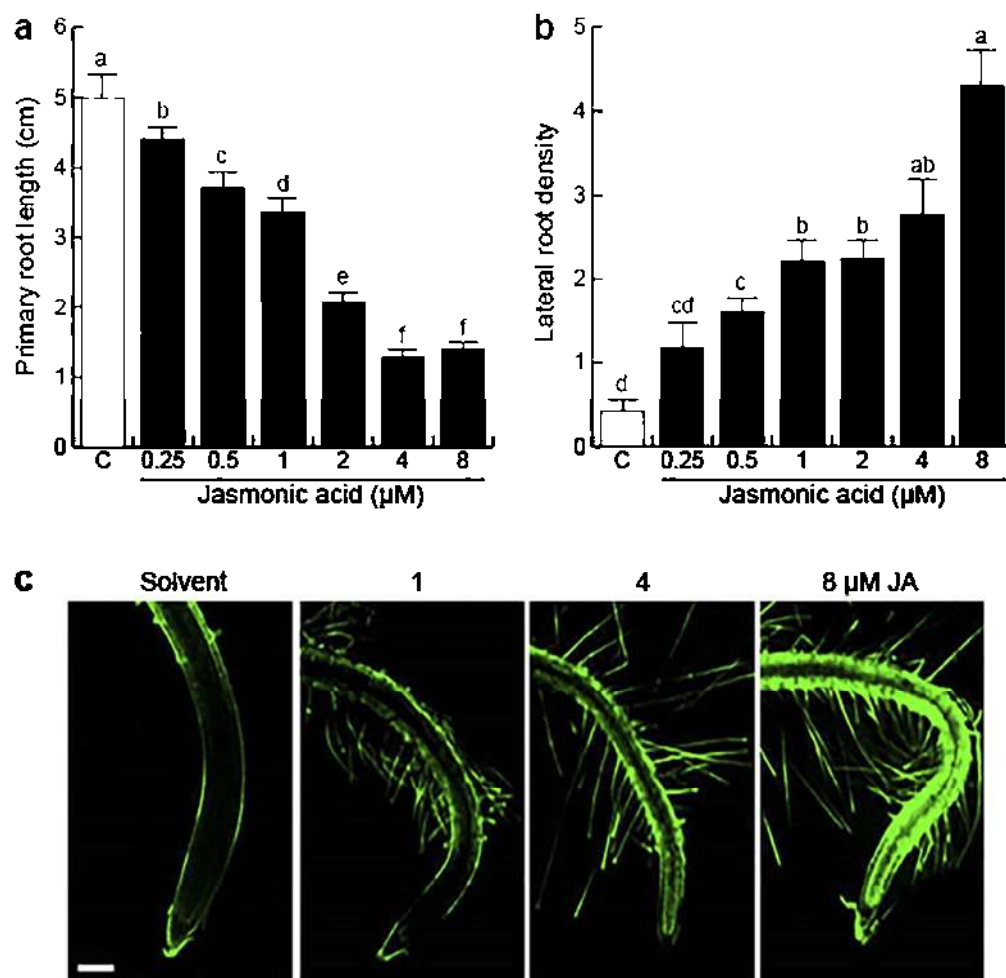


Fig. 1 Effects of JA on root architecture and nitric oxide accumulation in Arabidopsis. Primary root length (a) and lateral root density (b) were analyzed from 10-day-old WT (Col-0) seedlings germinated and grown on the indicated concentrations of JA. (c) NO detection on primary root tips of seedlings loaded with DAF-2DA and visualized by confocal microscope. Values shown in (a) and (b) represent the mean of 30 seedlings. Different letters are used to indicate means that differ significantly ($p < 0.05$). The experiment was repeated three times with similar results. Scale bar = 100 μm .

150x145mm (300 x 300 DPI)

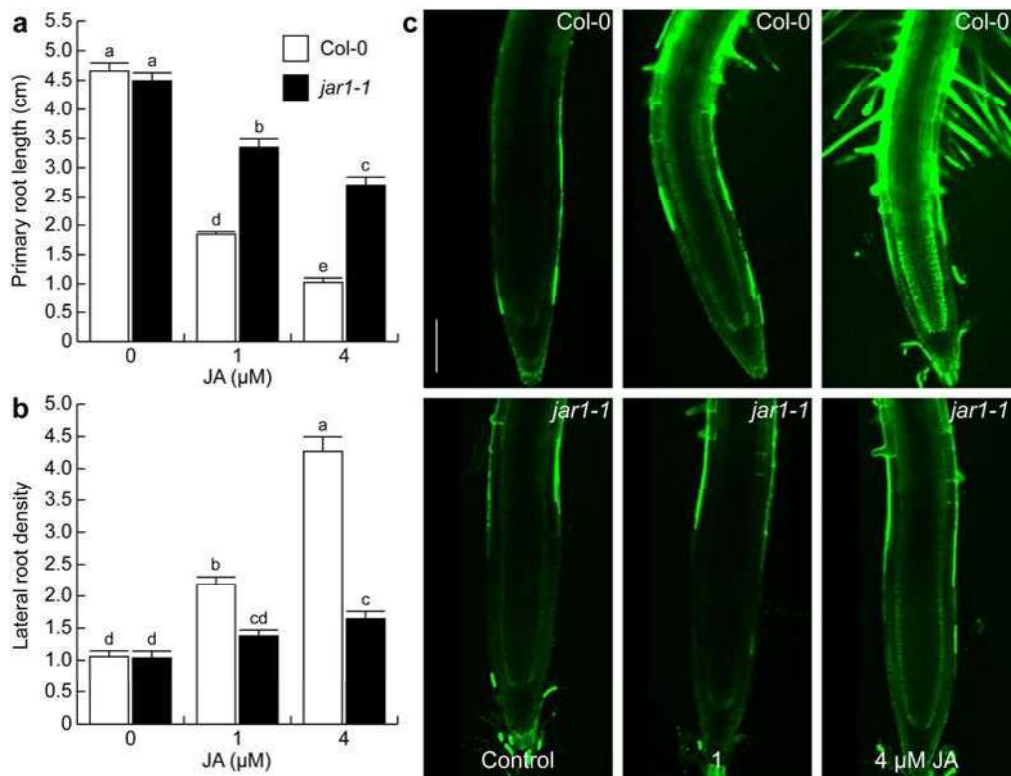


Fig. 2. Root response to jasmonic acid and nitric oxide accumulation in wild-type and jar1-1 Arabidopsis seedlings. WT and jar1-1 seedlings were germinated and grown on agar-solidified 0.2X MS media supplied with the solvent, or with 1 and 4 μM JA for 10 days. (a) Primary root length and (b) lateral root density were recorded. Values shown represent the mean ± standard deviation (n= 15). Different letters indicate statistical differences following a Tukey test analysis (p<0.05). (c) Representative micrographs of the detection of endogenous NO with 4,5-diaminofluorescein diacetate, which was determined in primary roots of at least 6 seedlings of each type and each growth condition mentioned above (scale bar= 100 μm). The experiment was repeated twice with similar results.

248x190mm (300 x 300 DPI)

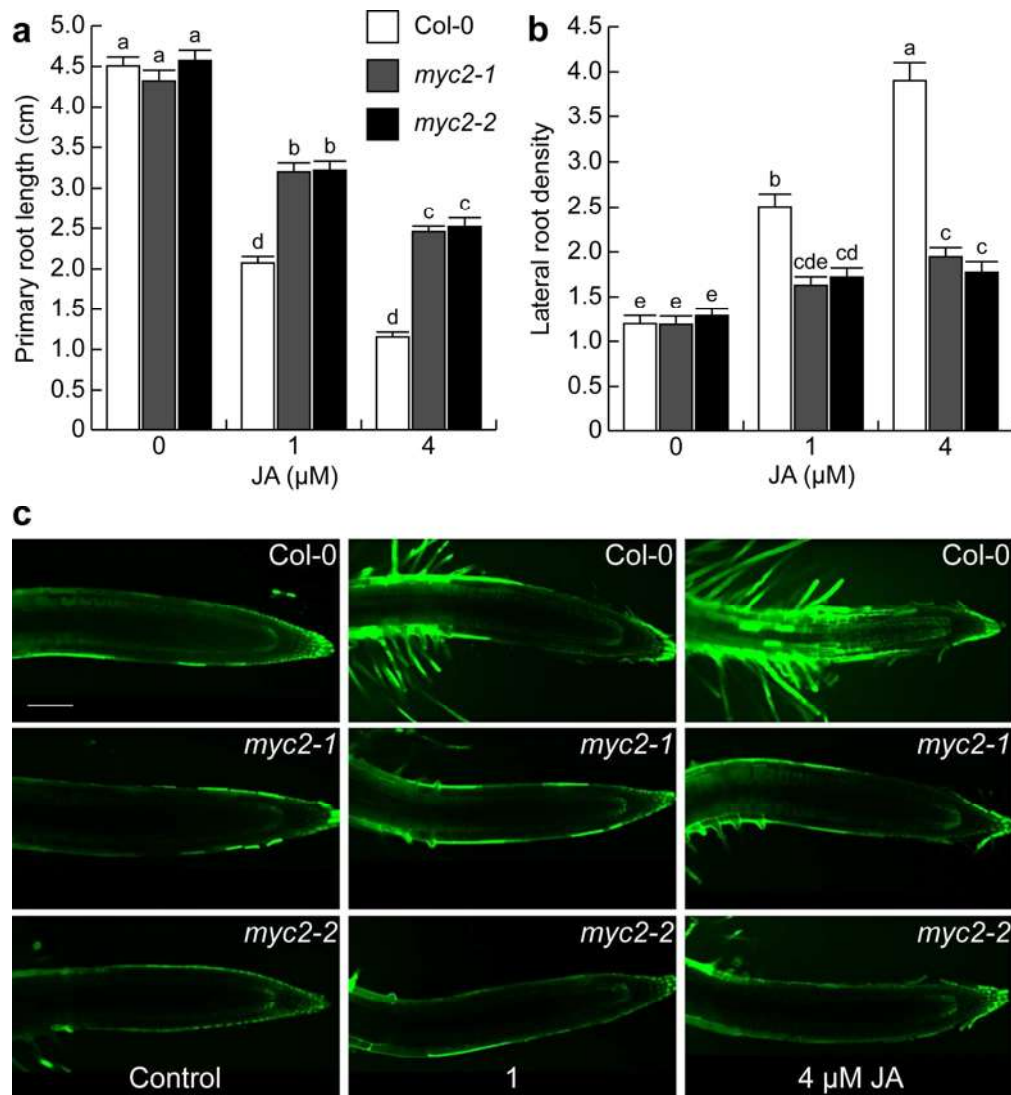


Fig. 3. Root response to jasmonic acid and nitric oxide accumulation in wild-type, *myc2-1* and *myc2-2* Arabidopsis seedlings. WT, *myc2-1* and *myc2-2* seedlings were germinated and grown on agar-solidified 0.2X MS media supplied with the solvent, or with 1 and 4 μM JA for 10 days. (a) Primary root length and (b) lateral root density were recorded. Values shown represent the mean $\pm$ standard deviation ($n=15$). Different letters indicate statistical differences following a Tukey test analysis ($p<0.05$). (c) Representative micrographs of the detection of endogenous NO with 4,5-diaminofluorescein diacetate, which was determined in primary roots of at least 6 seedlings of each type and each growth condition mentioned above (scale bar= 100 μm). The experiment was repeated twice with similar results.

197x214mm (300 x 300 DPI)

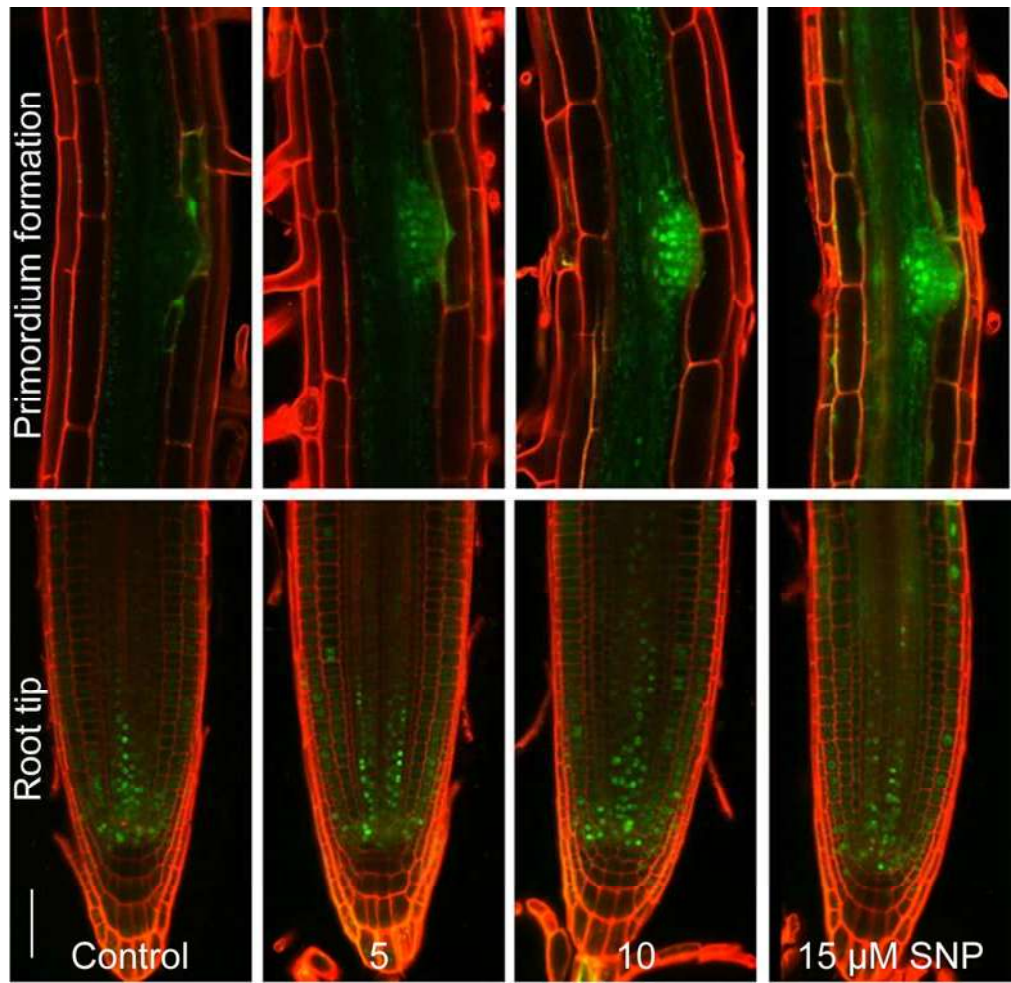


Fig. 4. Effect of nitric oxide donor sodium nitroprusside on JAZ10 expression in Arabidopsis roots. Transgenic Arabidopsis seedlings harboring the JAZ10-GFP gene construct were germinated and grown on agar-solidified 0.2X MS media supplied with the solvent, 5, 10 and 15 μM SNP for 10 days; at least 6 seedlings were incubated with propidium iodide, and confocal micrographs of expression pattern in two zones of primary root were taken (scale bar= 100 μm). The experiment was repeated twice with similar results.

154x150mm (300 x 300 DPI)

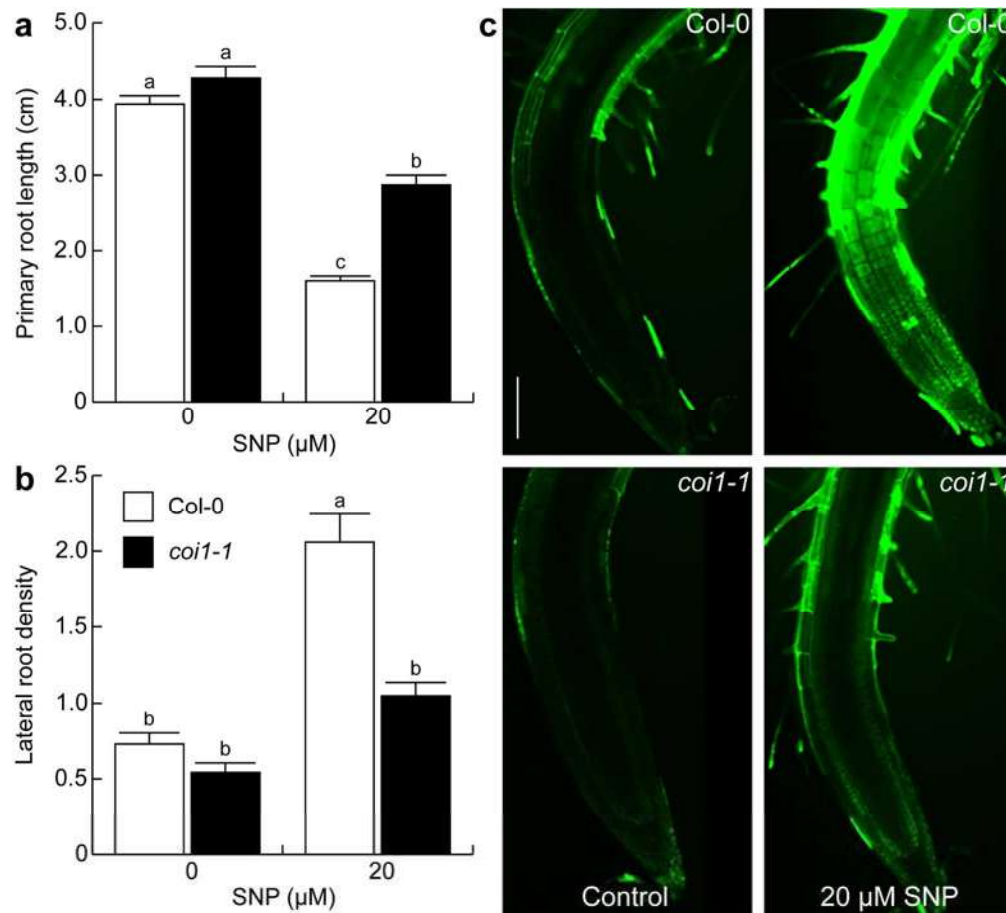


Fig. 5. Effect of nitric oxide donor sodium nitroprusside on root development and nitric oxide accumulation in wild-type and *coi1-1* seedlings. WT seeds were germinated and seedlings were grown on agar-solidified 0.2X MS media for two days, and homozygous *coi1-1* seedlings were selected from a *coi1-1*/COI1 segregating population in media supplemented with 4 μM JA two days after germination, subsequently wild-type and *coi1-1* seedlings were transferred to agar-solidified 0.2X MS media supplied with the solvent or 20 μM SNP for 8 days. (a) Primary root length and (b) lateral root density. Values shown represent the mean $\pm$ standard deviation ($n=15$). Different letters indicate statistical differences following a Tukey test analysis ($p<0.05$). (c) Representative confocal micrographs of the detection of endogenous NO with 4,5-diaminofluorescein diacetate in primary roots ($n=6$) (scale bar= 100 μm). The experiment was repeated twice with similar results.

209x190mm (300 x 300 DPI)

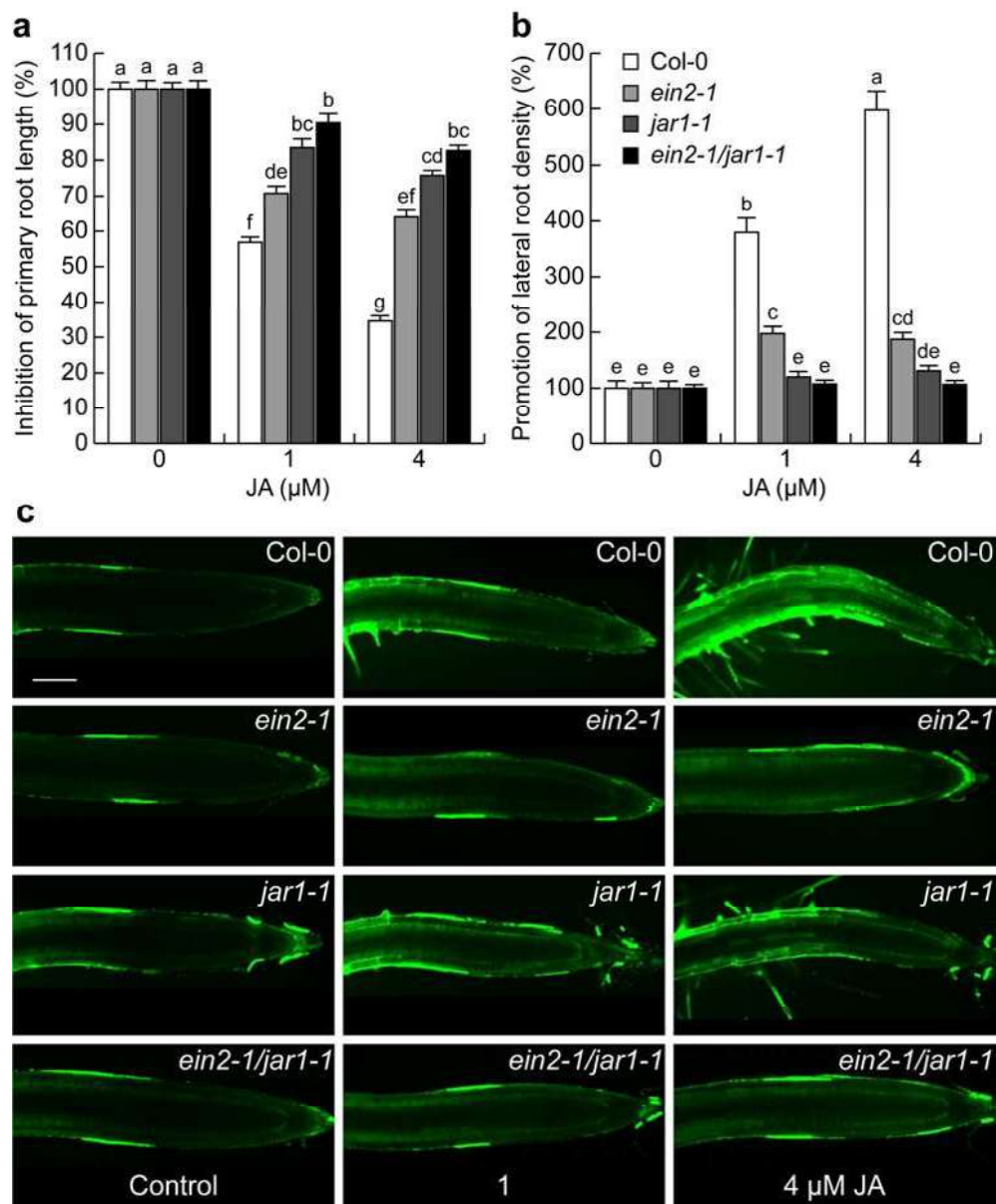


Fig. 6. Root response to jasmonic acid and nitric oxide accumulation in wild-type, *ein2-1*, *jar1-1*, and *ein2-1/jar1-1* Arabidopsis seedlings. WT, single and double mutant seedlings were germinated and grown on agar-solidified 0.2X MS media supplied with the solvent, 1 or 4 μ M JA for 7 days. (a) Inhibition of primary root length (percentage) and (b) Promotion of lateral root density (percentage) were recorded. Values shown represent the mean $\pm$ standard deviation (n= 30). Different letters indicate statistical differences following a Tukey test analysis ($p<0.05$). (c) Representative confocal micrographs of the detection of endogenous NO with 4,5-diaminofluorescein diacetate, which was determined in primary roots of at least 6 seedlings (scale bar= 100 μ m). The experiment was repeated twice with similar results.

200x244mm (300 x 300 DPI)

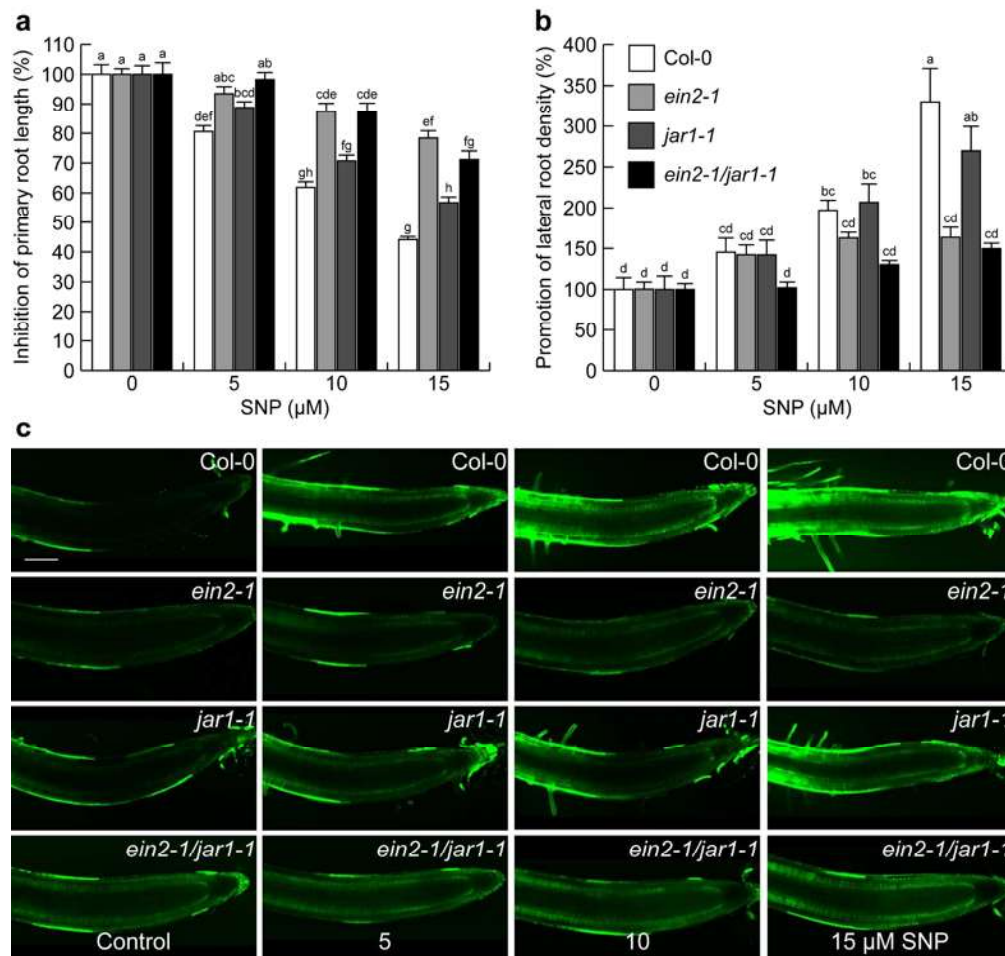


Fig. 7. Effect of nitric oxide donor sodium nitroprusside on root development and nitric oxide accumulation in wild-type, *ein2-1*, *jar1-1* and *ein2-1/jar1-1* seedlings. WT, single and double mutant seedlings were germinated and grown on agar-solidified 0.2X MS media supplied with the solvent, 5, 10 and 15 μ M SNP for 7 days. (a) Inhibition of primary root length (percentage) and (b) Promotion of lateral root density (percentage) were recorded. Values shown represent the mean $\pm$ standard deviation ($n=15$). Different letters indicate statistical differences of a Tukey analysis with a value at $p<0.05$. (c) Representative confocal micrographs of the detection of endogenous NO with 4,5-diaminofluorescein diacetate, which was determined in primary roots ($n=6$) (scale bar= 100 μ m). The experiment was repeated twice with similar results.

244x232mm (300 x 300 DPI)

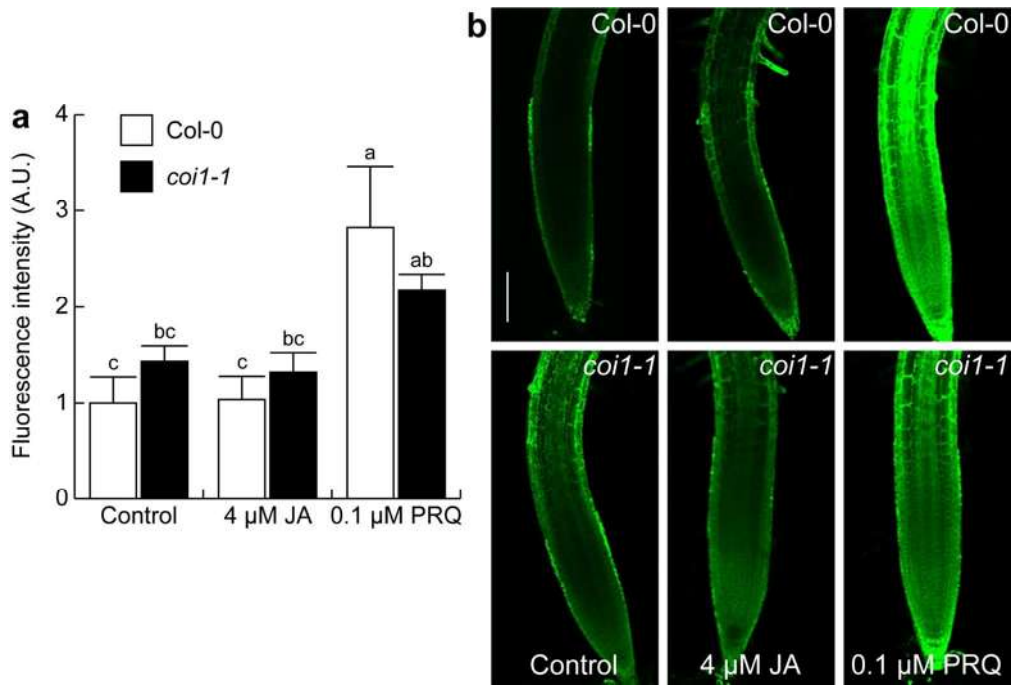


Fig. 8. Reactive oxygen species (ROS) accumulation in the primary root of wild-type and *coi1-1* mutant in response to jasmonic acid (JA), sodium nitroprusside (SNP) and paraquat (PRQ). Wild-type and *coi1-1* seedlings were germinated and grown on agar-solidified 0.2X MS media for two days, and homozygous *coi1-1* seedlings were selected from a *coi1-1*/COI1 segregating population in media supplemented with 4 μM JA two days after germination, subsequently wild-type and *coi1-1* seedlings were transferred to agar-solidified 0.2X MS media supplied with the solvent, 4 μM JA, 20 μM SNP or 0.1 μM PRQ for 8 days. (a) Fluorescence intensity was quantified using the IMAGEJ program in micrographs of the primary roots treated with 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H2DCF-DA). Values shown represent the mean ± standard deviation (n= 6). Different letters indicate statistical differences of a Tukey analysis with a value at $p<0.05$. (b) Representative confocal micrographs of the detection of endogenous ROS with H2DCF-DA mentioned above (scale bar= 100 μm). The experiment was repeated twice with similar results.

206x140mm (300 x 300 DPI)