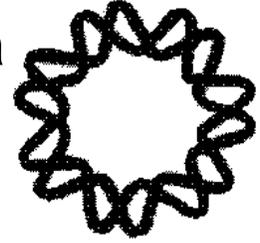




Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional Autónoma
de México



**"Análisis de la expresión de la región promotora del gen
de la ACCasa de frijol en *Arabidopsis thaliana*"**

T E S I S

que para obtener el grado de

Doctora en Ciencias Bioquímicas

p r e s e n t a

M. en C. Ma. Rosa Elia Figueroa Balderas



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fué realizado en el Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología-UNAM, bajo la asesoría del Dr. Mario Rocha Sosa. Este trabajo fué apoyado por los donativos de CONACyT (No. 28052N), de DGAPA-UNAM (Nos. IN212103 y IX215304), por la beca de Doctorado de CONACyT (No. Reg. 118120) y por la beca complementaria de Doctorado (DGEP)

Índice General

	Página
Índice de figuras	iii
Índice de tablas	iv
Lista de abreviaturas	v
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
2. Antecedentes	6
2.1. Respuesta de las plantas al ataque de patógenos	6
2.1.1. Respuestas inducidas por patógenos	6
2.1.2. Reconocimiento del patógeno	9
2.2. La enzima Acetil-CoA Carboxilasa	10
2.2.1. Estructura	10
2.2.2. Funciones y compartimentalización de la ACCasa	11
2.2.3. Regulación de la biosíntesis de la ACCasa cloroplástica	13
2.2.4. Regulación de la biosíntesis de la ACCasa citosólica	14
2.3. Flavonoides	15
2.3.1. Flavonoides y el estrés oxidativo	17
2.3.2. ERO y la defensa contra patógenos	19
2.3.3. Reguladores negativos del transporte polar de auxinas	20
2.4. Las fitohormonas en la defensa de las plantas	22
2.4.1. Las oxilipinas (Acido Jasmónico y Acido 12-oxo-fitodienoico)	22
2.4.2. El papel de las oxilipinas en la defensa	22
2.4.3. Etileno	24
2.4.4. Participación del etileno en la defensa de las plantas	25
2.5. Interacciones hormonales	25
2.5.1. La vía de señalización del JA	26
2.5.2. Interacción con etileno	27
2.5.3. Interacción con SA	29
3. Hipótesis y objetivos	31
3.1. Hipótesis	31

3.1. Objetivo general	31
3.2. Objetivos específicos	31
4. Materiales y métodos	32
4.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento	32
4.2. Identificación del promotor y clonación	32
4.3. Transformación de plantas de Arabidopsis y selección	34
4.4. Generación de cruzas	35
4.5. Detección histoquímica de GUS	35
4.6. Hibridación <i>in situ</i> de mRNA en plantas intactas	36
4.7. Transformación de raíces de frijol	37
4.8. Tratamientos	37
5. Resultados	39
5.1. Obtención de la región promotora de la ACCasa citosólica de frijol	39
5.2. Construcción de genes quiméricos y generación de plantas transgénicas	42
5.3. Análisis teórico de secuencias regulatorias en la región de control del gen de la PvACCasa	46
5.4. Patrón tejido-específico de plantas transgénicas expresando PvACCasa::GUS	47
5.5. Efecto de la aplicación exógena de auxinas sobre la inducción del promotor en raíces	50
5.6. El promotor del gen de la PvACCasa es inducido por estrés biótico y abiótico	51
5.7. Las vías de señalización de JA y etileno actúan de manera independiente en la inducción de la ACCasa en el desarrollo y defensa	55
5.8. Análisis de la expresión de genes de respuesta a estrés	57
5.9. El calcio participa en la inducción del promotor del gen de la PvACCasa	59
5.10. La inducción del promotor del gen de la PvACCasa en el hipocotilo en la oscuridad requiere de JA y etileno	60
6. Discusión	61
7. Conclusiones	68
8. Perspectivas	69
9. Referencias	70

Índice de figuras

Figura	Página
2.1. Mecanismos de defensa activados por un patógeno	8
2.2. Esquema de la reacción catalizada por la ACCasa	11
2.3. Esquema de la compartimentalización de la ACCasa en plantas	13
2.4. Esquema general de la síntesis de flavonoides	16
2.5. Señalización del H ₂ O ₂ en plantas	19
2.6. Acumulación bifásica de H ₂ O ₂	20
4.1. Esquema de la estrategia experimental utilizada para la obtención del promotor del gen de la PvACCasa	34
5.1. Obtención de un fragmento de la región codificante de la PvACCasa	39
5.2. Fragmentos obtenidos de la región promotora del gen de la PvACCasa	40
5.3. Comparación de las secuencias de la región codificante para el gen de la ACCasa	41
5.4. Análisis tipo southern de DNA genómico de frijol	42
5.5. Estrategia de clonación de los fragmentos del promotor del gen de la PvACCasa	43
5.6. Esquema de los fragmentos del promotor del gen de la PvACCasa fusionados al gen reportero GUS	44
5.7. Expresión de GUS en líneas transgénicas de Arabidopsis conteniendo diferentes fragmentos del promotor del gen de la PvACCasa	45
5.8. Efecto de la inundación sobre la expresión del promotor del gen de la PvACCasa	45
5.9. Comparación esquemática entre los promotores del gen de la ACCasa citosólica de frijol, soya y Arabidopsis	47
5.10. Patrón de expresión tejido-específico de plantas PvACCasa::GUS	48
5.11. Análisis histoquímico de la expresión del promotor del gen de la PvACCasa en raíces de Arabidopsis	48
5.12. Hibridación <i>in situ</i> del mRNA de la ACCasa en raíces de plantas intactas de frijol y Arabidopsis	49
5.13. Actividad de GUS en raíces transgénicas de frijol	50
5.14. Efecto de la aplicación de auxinas sobre la expresión del promotor del gen de la PvACCasa en raíces	51
5.15. Efecto de la herida sobre la expresión del promotor del gen de la PvACCasa	51
5.16. Inducción del mRNA del gen de la ACCasa en frijol y Arabidopsis en respuesta	52

a herida	
5.17. Efecto de la infección por patógenos sobre la expresión del promotor del gen de la PvACCasa	53
5.18. Efecto de la aplicación de hormonas y estrés oxidativo sobre la expresión del promotor del gen de la ACCasa	54
5.19. Efecto del H ₂ O ₂ sobre la expresión del mRNA del gen de la PvACCasa	55
5.20. Patrón de expresión tejido-específico en mutantes de Arabidopsis	56
5.21. Análisis por RT-PCR de la expresión de genes de respuesta a estrés	58
5.22. Efecto de las mutaciones <i>coi1-1</i> y <i>etr1-1</i> sobre la actividad de GUS en la oscuridad	60
8.1. Modelo propuesto de activación del promotor del gen de la PvACCasa	67

Índice de tablas

Tabla	Página
5.1. Efecto de la ausencia de calcio sobre la expresión del promotor del gen de la PvACCasa	59

Lista de abreviaturas

ACC	1-amino-cyclopropane carboxylic acid (ácido-1-aminociclopropanocarboxílico)
ACCasa	acetil coenzima A carboxilasa
4CL	4-hydroxycinnamoyl coenzyme A ligase (4-hidroxicinamoil-CoA ligasa)
Avr	gen de avirulencia
BC	biotin carboxylase (biotina carboxilasa)
BCCP	biotin carboxyl carrier protein (proteína biotinada acarreadora del carboxilo)
C4H	cinnamic acid 4-hydroxylase (cinamato 4-hidroxilasa)
ChI	chalcone isomerase (chalcona isomerasa)
ChS	chalcone synthase (chalcona sintasa)
<i>coi1-1</i>	coronatine insensitive (insensible a coronatina)
CT	carboxyl transferase (carboxil transferasa)
DFR	dihydroflavonol reductase (dihidroflavonol reductasa)
EGTA	tetraacetic acid (ácido tetracético)
<i>ERF1</i>	ethylene-response-factor1 (factor de respuesta a etileno 1)
ERO	especies reactivas de oxígeno
<i>etr1-1</i>	ethylene insensitive (insensible a etileno)
F3'H	flavonoid 3' hydroxylase (flavonoide 3' hidroxilasa)
F3H	flavanone hydroxylase (flavanona hidroxilasa)
FLS	flavonol synthase (flavonol sintasa)
GUS	β-glucuronidasa
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
RH	respuesta hipersensible
IAA	indole-3-acetic acid (ácido 3-indolacético)
JA	jasmonic acid (ácido jasmónico)
JERE	jasmonate and elicitors response element (elemento de respuesta a jasmonatos y eliciores)
LOX	lipoxygenase (lipoxigenasa)
MCP	muerte celular programada
MeJA	Methyl Jasmonate (Metil Jasmonato)
MS	medio Murashige y Skoog
NO	óxido nítrico
NPA	naphthylphthalamic acid (ácido 1-naftiltalámico)
OPDA	12-oxo-phytodienoic acid (ácido 12-oxo-fitodienoico)
<i>opr3</i>	12-oxo-phytodienoic acid reductase (ácido 12-oxo-fitodienoico reductasa)
ORCA	jasmonate-responsive transcriptional factor (factor transcripcional de respuesta a jasmonatos)
PAL	phenylalanine ammonia-lyase (fenilalanina amonio liasa)
<i>Pdfl.2</i>	gen de una defensiva vegetal que responde a JA y etileno
<i>PR</i>	pathogenesis related genes (genes relacionados a patogenicidad)
PRL	primordio de la raíz lateral
<i>Pst</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tabaci</i>
<i>Pst</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i>
R	gen de resistencia
RL	raíz lateral
RLA	resistencia local adquirida
RSA	resistencia sistémica adquirida
SA	salicylic acid (ácido salicílico)
VLCFA	very long chain fatty acids (ácidos grasos de cadena muy larga)
WRKY	Factor de transcripción que une específicamente la caja-W
ZE	zona de alargamiento de la raíz
ZM	zona meristemática de la raíz
ZT	zona de transición entre la raíz y el hipocotilo

Resumen

La productividad de las plantas se ve severamente afectada por condiciones de estrés biótico y abiótico. Las plantas responden a estas condiciones mediante adaptaciones bioquímicas y fisiológicas de las cuales alguna de éstas son el resultado de cambios en la expresión génica. Las investigaciones con plantas transgénicas y mutantes en las vías de señalización ofrecen un poderoso medio para obtener información acerca de los mecanismos que gobiernan las respuestas a estrés.

La acetil-CoA carboxilasa (ACCasa) en plantas es la responsable de sintetizar el malonil-CoA en plástidos, citosol y mitocondria. El malonil-CoA es utilizado en el citosol de las plantas para el alargamiento de ácidos grasos, la síntesis de suberina, ceras cuticulares, estilbenos, antocianinas, flavonoles e isoflavonoides para la protección y señalización. En frijol, el patrón de expresión de enzimas claves en la biosíntesis de flavonoides tales como chalcona sintasa (ChS) y fenilalanina amonio liasa (PAL) es inducido en respuesta al tratamiento con patógenos y elicitores. Recientemente en nuestro grupo, se aisló un cDNA parcial de la ACCasa citosólica de frijol y su transcrito se acumula por el tratamiento con un elicitor de levadura, metil jasmonato (MeJA) e infección con el patógeno *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* (Pst).

El objetivo del presente trabajo fué conocer los factores genéticos necesarios en la regulación de la expresión de la región promotora del gen de la ACCasa citosólica de frijol (PvACCasa). La región promotora de la PvACCasa fué clonada utilizando el kit "Universal Genome Walker" y fusionada al gen reportero de la β -glucoronidasa (GUS). Con este procedimiento se obtuvieron cuatro fragmentos traslapantes de la región de control del gen de la PvACCasa (2716, 786, 406 y 486 pb). Se construyeron cuatro fusiones promotor PvACCasa-GUS las cuales contienen cada uno de los fragmentos de la región de control aislados. Líneas transgénicas de *Arabidopsis* conteniendo 2716 pb de la región promotora mostraron actividad incrementada de GUS, sin embargo en líneas conteniendo 786 pb ó menos esta actividad se pierde. Estos resultados sugieren que se requieren más de 786 pb del promotor del gen de la PvACCasa para ser activo.

Los resultados presentados en este trabajo, demuestran que durante el desarrollo, la actividad de GUS se observó en los hidátodos, las estípulas, los estambres, el estigma, el polen, el embrión, las silicuas, la zona de extensión de la raíz y la zona de transición entre el hipocotilo y la raíz. Por otra parte, el promotor del gen de la PvACCasa fué activado por herida, MeJA, etileno, auxinas, H₂O₂ e infección con patógenos. Análisis de cruza con mutantes en la vía de señalización y biosíntesis de ácido jasmónico (*coi1-1* y *opr3*) y en la percepción de etileno (*etr1-1*) así como con una doble mutante (*coi1-1/etr1-1*) sugieren que la inducción del gen de la PvACCasa en respuesta a herida podría estar mediada por al menos tres vías independientes. En respuesta al estrés oxidativo provocado por patógenos, la inducción del promotor del gen de la PvACCasa es mediada por vías de señalización dependientes de ácido jasmónico o etileno.

Abstract

Plant productivity is dramatically affected by biotic and abiotic stress conditions. Plants respond to these stress conditions by means of biochemical and physiological adaptations of which any of these are the result of changes in gene expression. With the use of transgenic and mutant plants present study was dedicated to the analysis of the problem of the signaling pathways and related mechanisms involved in plant stress responses .

In plants, acetyl-CoA carboxylase (ACCase) catalyses the synthesis of malonyl-CoA in plastids, cytosol and mitochondria. Malonyl-CoA is used in plant cytosol for fatty acid elongation, the synthesis of suberin, cuticular waxes, flavonols, anthocyanins and isoflavonoids for plant protection and signaling. In common bean, the expression pattern of key flavonoid biosynthetic enzymes, such as chalcone synthase (ChS) and phenylalanine ammonia lyase (PAL) is induced in response to pathogen and elicitor treatments. Recently in our group a partial cDNA of common bean multifunctional ACCase was isolated whose transcript is accumulated by elicitor, *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* (Pst) and methyl jasmonate (MeJA) treatments.

The objective of this work was to know the required genetic and other factors involved in regulation of expression of *Phaseolus vulgaris* ACCase gene promoter (PvACCase). In this work we cloned the PvACCase promoter using the “Universal Genome Walker” kit. This procedure permitted us to clone four overlapping fragments of the PvACCase promoter region (2716, 786, 486 and 406 bp). We constructed four PvACCase promoter-GUS fusions, which contained each of the indicated fragments of the promoter region. *Arabidopsis* transgenic plants carrying 2716 bp of the promoter region showed increased GUS activity, instead lines carrying promoter fragments of 786 bp or less did not show GUS activity. These results suggest that > 786 bp of promoter region are required for activation of PvACCase gene promoter.

We identified PvACCase activity in *Arabidopsis* during the development in hydathodes, stipules, stamens, stigma, pollen, embryos, siliques, root elongation zone and the hypocotyl/root transition zone. PvACCase gene promoter was also activated by wounding, pathogen infection, H₂O₂, MeJA, ethylene, or auxin treatments. Analysis of crosses with mutants in the synthesis and signaling of jasmonic acid (*coi1-1* and *opr3*) and in the ethylene perception (*etr1-1*) as well as with a double mutant (*coi1-1/etr1-1*) suggest that the PvACCase gene activation in response to wounding could be mediated by at least three independent pathways. In response to oxidative stress produced by pathogen infection, the induction of PvACCase gene was mediated independently by either jasmonic acid or ethylene independent signaling pathways. *COI1* and *ETR1* signaling pathways are required for this activation.

1. Introducción

Las plantas están continuamente expuestas a condiciones ambientales desfavorables y confinadas al lugar en donde crecen, por tanto, han desarrollado mecanismos de adaptación para contender con el estrés ambiental el cual es percibido y mediado por una compleja red de vías de señalización. Entre estas señales, los componentes biológicamente activos de la ruta de los octadecanoides, como el ácido oxo-fitodienoico (OPDA) y jasmónico (JA) son reconocidos como potentes moléculas regulatorias en procesos de defensa de las plantas (Turner *et al.*, 2002). Además de esto, la planta sintetiza múltiples moléculas de señalización tales como óxido nítrico (NO), ácido salicílico (SA) y etileno, para provocar la inducción de proteínas antimicrobianas, metabolitos secundarios y reacciones de fortificación de la pared celular (Hammond-Kosack y Jones, 1996; Beligni y Lamattina, 2001).

Los metabolitos secundarios parecen funcionar principalmente en defensa contra depredadores y patógenos y en brindar ventaja reproductiva como atrayentes de polinizadores y diseminadores de semilla. También pueden actuar como venenos para crear una ventaja competitiva contra especies rivales.

En el laboratorio estamos interesados en conocer la respuesta de las plantas ante el ataque de patógenos. En respuesta al ataque de un patógeno, la síntesis *de novo* de un gran número de compuestos de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana llamadas **fitoalexinas** las cuales son inducidas y se acumulan en altas concentraciones, ayudando a limitar la invasión del mismo (VanEtten *et al.*, 1994). La producción de fitoalexinas parece ser un mecanismo común de resistencia a microbios patogénicos en la mayoría de las plantas. Las plantas emplean diferentes tipos de productos secundarios como fitoalexinas, tales como fenilpropanoides, isoprenoides y alcaloides. Las fitoalexinas sintetizadas por leguminosas pertenecen al grupo de los fenilpropanoides (isoflavonoides), mientras que en plantas como papa, tabaco y tomate varios sesquiterpenos son producidos como fitoalexinas.

El acetil-CoA es un metabolito intermediario que se requiere tanto para procesos catabólicos como anabólicos. La ACCasa es una enzima biotinilada que cataliza la carboxilación dependiente de ATP del acetil-CoA para formar malonil-CoA. En plantas la ACCasa se encuentra presente en dos formas estructuralmente diferentes, una forma homodimérica multifuncional en el citosol (Harwood, 1988) y una forma heterodimérica en los plástidos (Sasaki *et al.*, 1993). El malonil-CoA cloroplástico es utilizado para la síntesis de ácidos grasos (Pollar y Stumpf, 1980) y el citosólico se requiere para una amplia variedad de reacciones y rutas metabólicas como el alargamiento de ácidos grasos, la formación de suberinas y cutícula, malonilación de aminoácidos, inactivación del precursor del etileno (Liu *et al.*, 1983), síntesis de flavonoides y estilbenos (Ebel *et al.*, 1984).

Hay evidencias de que la ACCasa citosólica (ACC1) es determinante para el desarrollo de *Arabidopsis*. En este sentido, Baud *et al.* (2004) demostraron que mutantes en el gen GURKE (el cual codifica para ACC1) están afectadas en el desarrollo del embrión y este fenotipo es revertido con la aplicación exógena de malonato, sugiriendo que la ACCasa es esencial para el desarrollo normal del embrión.

Como se mencionó anteriormente, el malonil-CoA citosólico sintetizado por la ACCasa multifuncional es utilizado para la síntesis de flavonoides. Los flavonoides desarrollan diferentes actividades: como reguladores negativos endógenos del transporte polar de auxinas así como depuradores de radicales libres (Yamasaki *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 2001). Además, los descubrimientos de que la actividad total de la ACCasa citosólica incrementa con luz UV (Ebel y Halbrock, 1977) y que el transcrito de la forma eucariótica de la ACCasa de alfalfa se induce por elicitores de hongos o levadura (Shorrosh *et al.*, 1994) sugieren que la forma eucariótica de la ACCasa participa en la síntesis de compuestos protectores. Por otra parte, se ha demostrado que en frijol el patrón de expresión de enzimas claves involucradas en la síntesis de flavonoides (ChS y PAL) se induce en respuesta a la infección por patógenos y elicitores (Bell *et al.*, 1984; Ryder *et al.*, 1984; Lawton y Lamb, 1987; Jakobek y Lindgren, 1993).

Recientemente en nuestro grupo se aisló un cDNA parcial de la ACCasa multifuncional de frijol (PvACCasa) y el transcrito correspondiente se acumula por el tratamiento con metil jasmonato (MeJA), *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* (Pst) y elicitor de levadura (García-Ponce y Rocha-Sosa, 2000). Por otra parte, se ha encontrado que el etileno y las oxilipinas podrían ser mediadores en la respuesta a Pst (García-Ponce, 2000; García-Ponce, datos no publicados). Se demostró además, que Pst induce la síntesis de las fitoalexinas. A este respecto, se ha visto que los niveles de un intermediario de la síntesis de JA, como el ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA), se incrementan en respuesta a la aplicación de un elicitor (Müller *et al.*, 1993), además este compuesto tiene la capacidad de inducir la expresión de genes de defensa y la acumulación de fitoalexinas (Blechert *et al.*, 1995), por lo que este compuesto puede ser un candidato para desencadenar la señal de acumulación de fitoalexinas en frijol. Además, se ha visto que genes de la ChS (Creelman *et al.*, 1992) y PAL (Gundlach *et al.*, 1992) de soya son inducidos bajo tratamiento con ácido jasmónico (JA), sugiriendo un papel del JA como mediador en la síntesis de flavonoides.

En el presente trabajo se clonó la región promotora de la ACCasa citosólica de frijol, la cual sorprendentemente mostró una identidad del 80 % con respecto a la región correspondiente del gen de la ACCasa de soya y analizamos en *Arabidopsis* la expresión del promotor fusionado al gen reportero GUS durante el desarrollo y en plantas bajo diferentes condiciones de estrés. Además, se analizó la participación del JA y etileno en la inducción del promotor, utilizando mutantes en la síntesis y percepción del JA así como en la percepción del etileno.

2. Antecedentes

2.1. Respuesta de las plantas al ataque de patógenos

En la naturaleza, las plantas están expuestas a un gran número de organismos patógenos como insectos, hongos, bacterias y virus. Las plantas son organismos sésiles que carecen de un sistema inmune. Sin embargo, en respuesta al ataque de un patógeno, las células vegetales poseen mecanismos de defensa constitutivos e inducidos los cuales son efectivos para detener o impedir la infección. Los mecanismos de defensa constitutivos detienen la entrada de patógenos a la célula vegetal. Estos actúan constantemente en la planta y se basan en el uso de herramientas químicas y estructurales. Las herramientas químicas que las células vegetales son capaces de producir y almacenar incluyen una gran diversidad de sustancias tóxicas para los organismos patógenos como, por ejemplo, la síntesis de flavonoides, alcaloides, fenoles o polifenoles (taninos), aceites esenciales y terpenos generalmente denominados fitoalexinas (Fritig *et al.*, 1998). Entre las herramientas estructurales, la producción de una cubierta protectora en la superficie del tejido infectado es de gran importancia. Esta cubierta, se le denomina cutícula, está constituida por cutina (polímero de ácidos grasos hidroxilados de cadena larga), suberina (polímero de ácidos grasos hidroxilados y alcoholes de cadena larga) y ceras (mezcla de lípidos de cadena larga). Estos constituyentes forman una capa hidrofóbica e impermeable sobre la pared de las células de la epidermis (Lamb *et al.*, 1989).

2.1.1. Respuestas inducidas por patógenos

Ambos tipos de herramientas, químicas y estructurales, brindan a las plantas la capacidad de detener la entrada de la gran mayoría de los agentes patógenos a los que se ven expuestas. Sin embargo, algunos patógenos pueden entrar al organismo, por lo que la planta puede activar mecanismos de defensa con el fin de detener la infección. Cuando la célula vegetal percibe la presencia de un patógeno, se activa una fuerte reacción de defensa inducida (Figura 2.1). Esta reacción es severa a nivel local, en el tejido que está directamente en contacto con el patógeno, y más ligera a nivel sistémico, en los tejidos no

infectados de la planta. Básicamente este tipo de reacción permite potenciar las barreras, tanto químicas como estructurales, que los tejidos vegetales mantienen en forma constitutiva (Lamb *et al.*, 1989).

En la respuesta local ocurre la llamada respuesta hipersensible (RH), la cual implica una muerte celular del tejido infectado por un patógeno (Dang *et al.*, 1996). La RH (Figura 2.1) se produce fundamentalmente por activación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y ácido salicílico (SA). Además, estas células producen altas concentraciones de otras hormonas como etileno, ácido jasmónico (JA) y sus derivados, óxido nítrico (NO) y fitoalexinas (McDowell y Dangl, 2000). Es interesante destacar que en esta respuesta se lleva a cabo el reforzamiento de la pared celular, para impedir el aumento y la difusión del patógeno hacia el resto de la planta. La acumulación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), realiza una función clave en el reforzamiento de la pared celular mediante el entrecruzamiento de proteínas de la pared celular y su lignificación (Olson y Varner, 1993; Brison *et al.*, 1994).

En los tejidos que rodean al sitio de entrada del patógeno ocurre una respuesta denominada resistencia local adquirida (RLA). En estos tejidos se acumulan ERO, SA, JA y etileno en concentraciones más bajas que en las células infectadas (Figura 2.1). Estos compuestos provocan la activación de un gran número de genes de defensa. Un grupo de estos genes codifica enzimas de las rutas de síntesis de fitoalexinas, provocando un aumento sostenido en la producción de estos compuestos antimicrobianos y de fenoles precursores de la lignina (Fritig *et al.*, 1998). Un segundo grupo de genes de defensa codifica proteínas estructurales de la pared celular, contribuyendo a su reforzamiento. Un tercer grupo codifica enzimas encargadas de detoxificar y proteger al tejido vegetal del daño oxidativo y un cuarto grupo de genes codifica enzimas que degradan la pared celular de hongos y bacterias (β -1,3-glucanasas y quitinasas). En consecuencia, la RLA permite proteger al tejido que rodea el sitio de infección, potenciando las barreras químicas y estructurales (Fritig *et al.*, 1998).

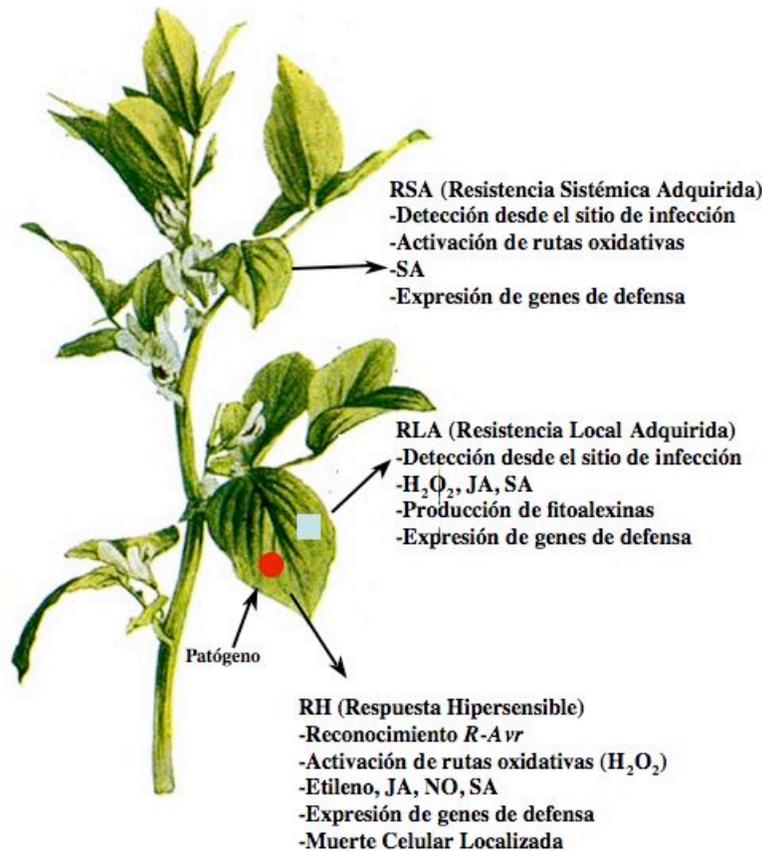


Figura 2.1. Mecanismos de defensa activados por un patógeno. La figura muestra las reacciones de defensa que ocurren en las células infectadas (Respuesta hipersensible, RH), en el tejido vecino al sitio de infección (Resistencia Local Adquirida, RLA) y en los tejidos distantes al sitio de infección (Resistencia Sistémica Adquirida, RSA). SA, ácido salicílico; JA, ácido jasmónico; NO, óxido nítrico.

En los tejidos distantes al sitio de infección se produce una respuesta denominada resistencia sistémica adquirida (RSA). Esta respuesta es similar a la reacción RLA, sólo que es más atenuada. La RSA está destinada fundamentalmente a proteger o inmunizar al resto de la planta frente a una segunda infección por el mismo u otro agente patógeno (Figura 2.1). Uno de los aspectos interesantes del desarrollo de la RSA, es que el tejido infectado debe enviar señales químicas al resto de la planta para que esta reacción se active (Ryals *et al.*, 1996). Durante varios años se pensó que el SA era la señal sistémica. Sin embargo, existen datos que indican que el metil-salicilato (MeSA) puede servir como una señal volátil involucrada en la comunicación dentro de la planta, así como entre plantas durante la infección por patógenos (Shulaev *et al.*, 1997). En conjunto, estas respuestas de defensa inducidas permiten detener la proliferación del patógeno y su

diseminación desde el sitio de infección al resto de la planta. Además, permiten a la planta desarrollar un estado de resistencia que le proporciona inmunidad durante varias semanas contra una segunda infección. Para que estas reacciones inducidas ocurran, es imprescindible que la planta detecte la presencia del patógeno.

2.1.2. Reconocimiento del patógeno

En las plantas, la resistencia al ataque de un patógeno está generalmente asociada con la activación de una amplia variedad de mecanismos de defensa que sirven para prevenir la replicación o difusión del patógeno. En algunas interacciones planta-patógeno la habilidad de la planta para reconocer al patógeno y activar estos mecanismos de defensa es regulada en una manera específica gen a gen mediante la interacción directa o indirecta entre los productos de un gen de resistencia de la planta (*R*) y los productos de un gen de avirulencia del patógeno (*Avr*) (Flor, 1971; Keen, 1990). Los genes de resistencia caracterizados hasta la fecha tienen la capacidad de reconocer sólo una proteína específica de un patógeno en particular y se pueden encontrar en la membrana plasmática o en el citoplasma de la célula vegetal (McDowell y Dangl, 2000). En consecuencia, si la planta es infectada con un patógeno para el cual no posee una proteína que le permita reconocerlo, el patógeno puede proliferar e invadir los tejidos ocasionando una enfermedad.

Las plantas además son capaces de detectar fragmentos de oligosacáridos derivados de la ruptura de la pared celular vegetal los cuales actúan como elicitores inespecíficos (Somssich y Halbrock, 1998). De esta forma, las plantas pueden activar sus mecanismos de defensa inducidos cuando detectan daño celular masivo. Sin embargo, si el patógeno logra proliferar a otros tejidos antes de ser detectado por estos sistemas, se desencadena la enfermedad.

El primer evento que ocurre (a los pocos minutos después del reconocimiento) es la producción de ERO en la pared celular, lo que se ha denominado explosión oxidativa. El H_2O_2 y otras especies oxidantes producidas se difunden al interior de la célula y activan

una vía de transducción de señales que se propaga hasta el núcleo para inducir la expresión de genes de defensa (Somssich y Halbrock, 1998). En particular, la producción de especies oxidantes lleva a la expresión de genes que protegen al tejido vegetal del daño oxidativo. En una segunda etapa (a las pocas horas después del reconocimiento) se acumulan en la célula vegetal etileno, JA y NO (Fritig *et al.*, 1998). Estos reguladores, junto con las ERO, activan vías de transducción de señales que inducen la expresión de genes involucrados en la síntesis de compuestos fenólicos (precursores de lignina y SA) y de fitoalexinas. El SA producido actúa por una parte como un agente oxidante, potenciando la expresión de genes que protegen del daño oxidativo. Por otra parte, el SA activa vías de transducción que llevan a la expresión de genes que codifican las enzimas β -1,3-glucanasa y quitinasa que degradan la pared celular de bacterias y hongos (McDowell y Dangl, 2000).

2.2. La enzima Acetil-CoA Carboxilasa

Como se mencionó en la sección anterior, en respuesta al ataque de un patógeno las células vegetales son capaces de sintetizar flavonoides, los cuales actúan como fitoalexinas. La biosíntesis de flavonoides requiere de malonil-CoA el cual es sintetizado por la enzima Acetil-CoA carboxilasa (ACCase).

2.2.1. Estructura

La ACCase es una enzima biotinilada que cataliza la carboxilación dependiente de ATP del acetil-CoA para formar malonil-CoA. En la naturaleza, la ACCase se encuentra presente en dos formas estructuralmente diferentes, una heteromérica (Sasaki *et al.*, 1993) y una forma homodimérica (Harwood, 1988). La forma heteromérica se encuentra presente en procariotes. Esta enzima está constituida por cuatro subunidades dissociables: El péptido que une covalentemente la biotina (BCCP), la subunidad que carboxila a la biotina (BC) y un complejo de dos subunidades α y β que carboxilan al acetil-CoA para formar malonil-CoA (CT) (Sasaki *et al.*, 1995). Este proceso se lleva a cabo en dos

reacciones (Figura 2.2). Estas cuatro subunidades forman un complejo muropeptídico de más de 650 kDa, el cual puede estar asociado a membranas.

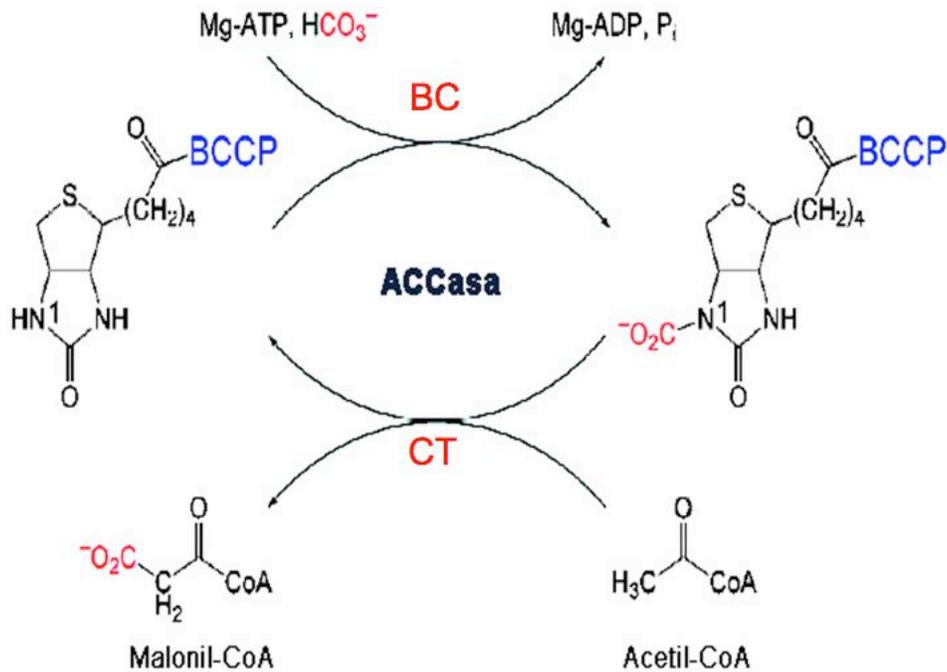


Figura 2.2. Esquema de la reacción catalizada por la ACCasa. En una reacción dependiente de ATP, la BC activa CO_2 (como HCO_3^-) uniéndolo al nitrógeno del anillo de biotina de la BCCP. El brazo biotina flexible de la BCCP lleva el CO_2 activado del sitio activo de la BC al sitio CT. La CT transfiere el CO_2 activado de la biotina al acetil-CoA produciendo malonil CoA (modificado de Tong, 2005).

La forma homodimérica se encuentra presente en eucariotes y está compuesta de un gran polipéptido que tiene integradas las cuatro subunidades descritas anteriormente. Este polipéptido individual es de aproximadamente 250 kDa y es funcionalmente activo al formar un homodímero de 500 kDa.

2.2.2. Funciones y compartimentalización de la ACCasa en plantas

En todas las plantas excepto gramíneas existen las dos formas de la ACCasa. La forma procariótica está localizada solamente en cloroplastos y la forma eucariótica puede estar tanto en el citosol como en el cloroplasto. En gramíneas la forma procariótica no se encuentra e isozimas del tipo eucariótico se expresan en cloroplasto, citosol y

mitocondria (Sasaki *et al.*, 1995; Konishi *et al.*, 1996; Focke *et al.*, 2003). Un caso interesante es el de especies de la familia Brassicaceae, en estas plantas se ha reportado la existencia de ambos tipos de enzimas (eucariótica y procariótica) en cloroplastos, además de la presencia de la forma eucariótica en el citosol (Schulte *et al.*, 1997).

Las plantas son capaces de transportar azúcares y aminoácidos, pero no ácidos grasos sintetizados por las células del mesófilo. Generalmente, cada célula sintetiza los ácidos grasos que requiere. La síntesis *de novo* de ácidos grasos se lleva a cabo predominantemente en el cloroplasto, y pasan a través de la membrana del cloroplasto para su modificación en el citosol de acuerdo a las necesidades de la planta. El precursor malonil-CoA no puede pasar a través de la membrana del cloroplasto así que debe ser sintetizado en cloroplasto, citosol o mitocondria por la ACCasa de acuerdo a los requerimientos de la célula (Figura 2.3) (Sasaki y Nagano, 2004).

En el cloroplasto, el malonil-CoA es utilizado principalmente para la síntesis de ácidos grasos (de hasta C16:0, C16:1 y C18:1) mientras que en el citosol, el malonil-CoA es utilizado para la síntesis de ácidos grasos de cadena mas larga (VLCFA, \geq C20), síntesis de flavonoides, síntesis de antocianinas, la malonilación de D-aminoácidos, así como la malonilación del ácido-1-aminociclopropanocarboxílico (ACC) el cual es el precursor de la síntesis de etileno. La malonilación del ACC reduce los niveles de producción de etileno. En mitocondria, el malonil-CoA sintetizado por la ACCasa es utilizado para la síntesis de ácidos grasos de cadena corta, los cuales son precursores en la biosíntesis del ácido lipoico. El ácido lipoico es un grupo prostético importante de algunas enzimas mitocondriales. El malonil-CoA también se utiliza para la síntesis de algunos ácidos grasos de cadena larga que se requieren para la reparación de lípidos mitocondriales (Gueguen *et al.*, 2000).

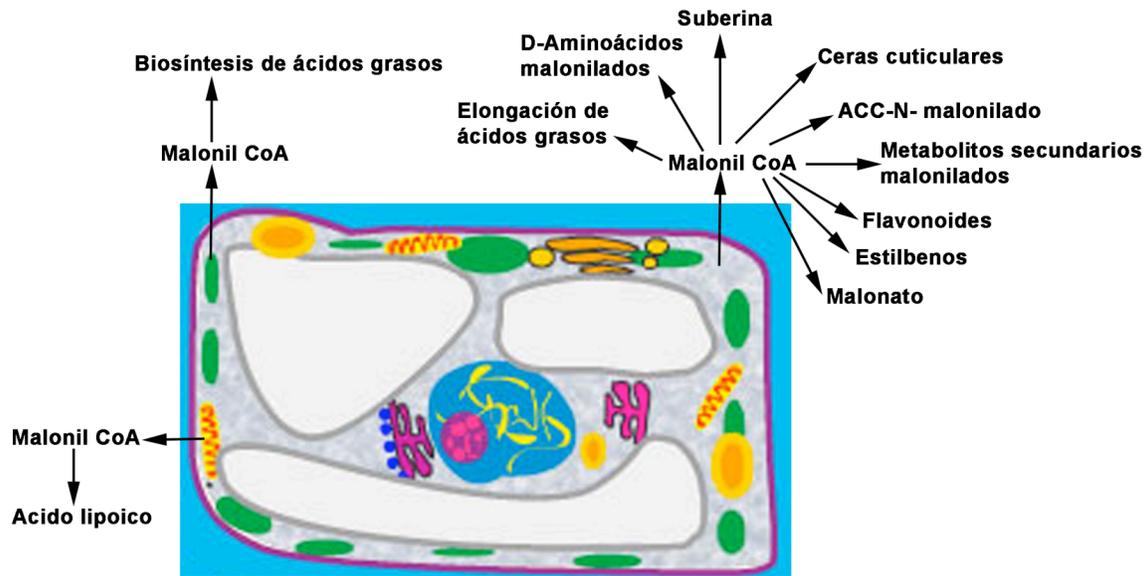


Figura 2.3. Esquema de la compartimentalización de la ACCasa en plantas. Debido a que el malonil-CoA es impermeable a las membranas, éste es generado independientemente en los diferentes organelos (cloroplastos, mitocondrias y citosol) y es utilizado de acuerdo a los requerimientos de la planta.

2.2.3. Regulación de la biosíntesis de la ACCasa cloroplástica

La regulación de la biosíntesis de la ACCasa cloroplástica se ha estudiado principalmente analizando la acumulación de las subunidades individuales y sus correspondientes transcritos durante el desarrollo de la planta. Estos estudios se han enfocado específicamente sobre el desarrollo de las semillas, en donde los ácidos grasos son utilizados tanto para el ensamblaje de lípidos membranales como para la biogénesis del triacilglicerol que es depositado como aceite. De acuerdo a las demandas metabólicas de malonil-CoA en el cloroplasto, los niveles de las subunidades de la ACCasa y sus transcritos se acumulan en semillas en desarrollo y en hojas (Ke *et al.*, 2000; Thelen *et al.*, 2001).

2.2.4. Regulación de la biosíntesis de la ACCasa citosólica

La mayoría de los estudios sobre la expresión de la ACCasa citosólica se han enfocado en los mecanismos que controlan la biosíntesis de la enzima durante el crecimiento y desarrollo o en respuesta a estímulos ambientales. En animales y levaduras, la actividad de la ACCasa es regulada por fosforilación/desfosforilación, por citrato y por el palmitoil-CoA. Por el contrario, en plantas, la actividad de la ACCasa citosólica no es regulada por ninguno de ellos (Roesler *et al.*, 1996). La expresión del gen de la ACCasa citosólica es tejido específica, por ejemplo en las hojas de *Allium porrum* la ACCasa citosólica, es más abundante en la epidermis que en las células del mesófilo (Caffrey *et al.*, 1998). En células de alfalfa, la expresión de la ACCasa citosólica es inducida por luz UV (Ebel *et al.*, 1974). La inducción de la ACCasa citosólica también se ve incrementada significativamente en cultivo de células de alfalfa y hojas de frijol tratadas con elicitores de levadura y de *Colletotrichum lindemuthianum* (Shorrosh *et al.*, 1994; García-Ponce y Rocha-Sosa, 2000), lo cual sugiere que este incremento se debe a la demanda de malonil-CoA necesario para sintetizar fitoalexinas del tipo flavonoide como parte de la respuesta de defensa.

Arabidopsis tiene dos genes posicionados en tándem que codifican la ACCasa citosólica (*ACC1* y *ACC2*). El gen *ACC2* tiene un exón adicional en el 5', que se encuentra también presente en el gen de la ACCasa citosólica de *Brassica napus*, la proteína codificada por este último gen se localiza en el cloroplasto, lo cual sugiere que el producto del gen *ACC2* podría estar localizado también en este organelo. *ACC1* representa la mayoría de la ACCasa citosólica expresada. Esta diferencia en el nivel de expresión entre los genes *ACC1* y *ACC2* se debe principalmente a un aumento en la transcripción del gen *ACC1*. Aunque se podría pensar en una redundante producción de malonil-CoA derivada de la ACCasa cloroplástica y citosólica en el cloroplasto, esta redundancia es evitada ya que el gen *ACC2* se transcribe a un nivel menor que el gen *ACC1* (Yanai *et al.*, 1995).

2.3. Flavonoides

Como se mencionó anteriormente, el malonil-CoA es un importante precursor para sintetizar varios compuestos de importancia biológica. La síntesis de flavonoides es sólo una de las rutas metabólicas que requieren de malonil-CoA. Los flavonoides son una clase de compuestos fenólicos que están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Más de 6000 flavonoides naturales han sido descritos y algunos de ellos son comunes en plantas superiores (Harborne y Williams 2000). Además de actuar como pigmentos en flores y frutos, los flavonoides están involucrados en una gran diversidad de funciones biológicas en plantas. Los flavonoides juegan un papel crucial en interacciones planta-microorganismo (formación de nódulos de bacterias fijadoras de nitrógeno en leguminosas) (Kobayashi *et al.*, 2004) y en la reproducción promoviendo el desarrollo del tubo polínico (Koes *et al.*, 1994). Los flavonoides también desempeñan diferentes papeles en la defensa contra el estrés en plantas, como en la protección contra el daño causado por patógenos, en la herida o en la luz UV excesiva (Dixon and Paiva 1995). La carencia de fósforo ó nitrógeno, y las bajas temperaturas afectan los niveles de flavonoides (Winkel-Shirley 2002). Los flavonoides, principalmente antocianinas protegen a las células de las hojas del daño foto-oxidativo, aumentando de esta forma la eficiencia en la recuperación de nutrientes durante la senescencia (Feild *et al.*, 2001).

Los flavonoides son sintetizados por la vía de los fenilpropanoides. Los fenilpropanoides son derivados de la fenilalanina la cual es convertida en ácido cinámico, por la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL). La ruta biosintética de los flavonoides inicia con la condensación de una molécula de 4-coumaril-CoA y tres moléculas de malonil-CoA, produciendo naringenina chalcona. Esta reacción es realizada por la enzima chalcona sintasa (ChS). La chalcona es convertida a una flavanona por la enzima chalcona isomerasa (ChI). A partir de estos intermediarios la ruta se ramifica dando como resultado diferentes clases de flavonoides. Un resumen de la ruta de los flavonoides es presentada en la figura 2.4. Hay evidencias de que las enzimas involucradas en el metabolismo de flavonoides pueden actuar como complejos multienzimáticos asociados a

membranas, lo cual tiene implicaciones en la eficiencia, especificidad y regulación total de la ruta (Winkel-Shirley, 2001).

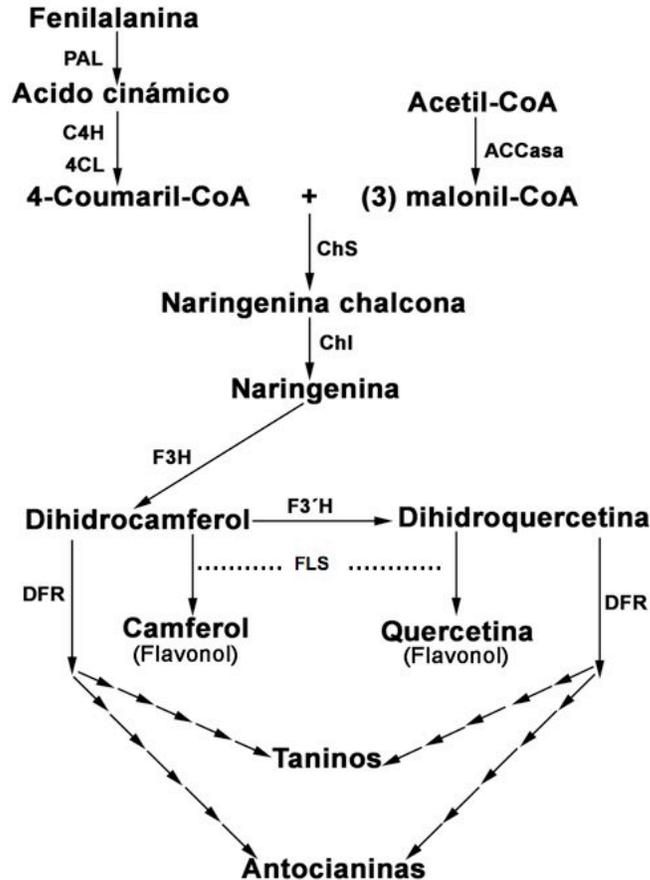


Figura 2.4. Esquema general de la síntesis de flavonoides. Las enzimas involucradas en esta ruta son: PAL, Fenilalanina amonio liasa; C4H, Cinamato 4-hidroxilasa; 4CL, 4-Hidroxicinamoyl-CoA ligasa; ACCasa, Acetil-CoA carboxilasa; ChS, Chalcona sintasa; ChI, Chalcona isomerasa; F3H, Flavonona hidroxilasa; F3'H, Flavonoid 3' hidroxilasa; DFR, Dihydroflavonol reductasa; FLS, Flavonol sintasa (Modificado de Saslowsky y Winkel-Shirley, 2001).

Desde el punto de vista evolutivo, se ha sugerido que la propiedad protectora de los flavonoides contra la radiación UV constituye una de las funciones más ancestrales en plantas. Los flavonoides son potentes compuestos absorbentes de luz UV y se acumulan principalmente en las células de la epidermis del tejido vegetal después de la inducción por luz UV. La radiación ultravioleta se clasifica en tres longitudes de onda: UV-A (320-

390 nm), UV-B (280-320 nm), and UV-C (<280 nm). La UV-B puede penetrar la capa del ozono y causar un severo daño a las plantas.

Varios estudios han demostrado que en las hojas de las plantas, la composición de los flavonoides cambia como consecuencia de luz excesiva o radiación UV (Lois 1994; Olsson *et al.*, 1998; Hofmann *et al.*, 2000; Tattini *et al.*, 2000; Kolb *et al.*, 2001). Por otra parte, también se ha demostrado la activación de los genes de la biosíntesis de flavonoides por radiación UV (Logemann *et al.*, 2000). La importancia de los flavonoides en la protección contra la radiación UV ha sido también estudiada por medio del uso de mutantes de *Arabidopsis* (Li *et al.*, 1993, Landry *et al.*, 1995, Havaux y Kloppstech, 2001) y petunia (Ryan *et al.*, 2002), en las cuales la producción de flavonoides está bloqueada y son por lo tanto sensibles a la radiación UV. De manera contraria, una mutante en *Arabidopsis* con elevada acumulación de flavonoides y otros compuestos fenólicos es tolerante a niveles extremadamente elevados de radiación UV-B (Bieza y Lois 2001).

2.3.1. Flavonoides y el estrés oxidativo

En plantas, la formación de radicales de oxígeno y de ERO son importantes para la activación de respuestas de defensa. Dentro de éstas se incluyen los radicales hidroxilo (OH \cdot), NO, y el anión superóxido (O $_2^{\cdot-}$). Otra ERO como H $_2$ O $_2$, el cual no es radical *per se*, pero actúa también como especie reactiva de oxígeno (Apel y Hirt, 2004; Pitzschke y Hirt, 2006). Varios estreses bióticos y abióticos están involucrados en la formación de ERO, entre los que se encuentran la sequía y desecación, estrés salino, frío, calor, metales pesados, radiación UV, ozono, herida, deficiencia nutricional, ataque por patógenos y luz excesiva (Figura 2.5). Los principales componentes celulares susceptibles a daño por radicales libres son los lípidos (peroxidación de ácidos grasos insaturados en membranas), proteínas (desnaturalización), carbohidratos y ácidos nucleicos (Breusegem *et al.*, 2001). Para controlar los niveles de ERO y proteger a las células en condiciones de estrés, los tejidos vegetales contienen varias enzimas depuradoras de ERO (superóxido dismutasa, catalasas, peroxidasas y glutatión peroxidasas), enzimas de detoxificación de

peroxidación de lípidos (glutación *S*-transferasa y ascorbato peroxidasa) y una serie de antioxidantes de bajo peso molecular (ascorbato, glutación, compuestos fenólicos y tocoferoles). Los compuestos fenólicos (flavonoides, taninos y precursores de lignina) son metabolitos secundarios abundantes en los tejidos vegetales (Grace y Logan, 2000). Estos compuestos poseen una estructura química ideal para actuar como compuestos depuradores de ERO y se ha demostrado *in vitro* que son antioxidantes más efectivos que los tocoferoles y el ascorbato (Huang *et al.*, 2005). Debido a que los flavonoides se encuentran distribuidos ampliamente en la vacuola, es improbable que estén involucrados en la depuración directa de ERO generadas en el cloroplasto. Sin embargo, el H₂O₂ a diferencia de otras ERO, es estable y es capaz de difundir a través de membranas, por lo que se ha propuesto un sistema flavonol-peroxidasa, para la detoxificación de H₂O₂ en la vacuola (Yamasaki *et al.*, 1997).

El H₂O₂ también está involucrado en la regulación de la expresión de genes inducidos por el estrés abiótico. Por ejemplo, se ha demostrado que la expresión de genes, inducida por radiación UV-B, ocurre vía el H₂O₂, ya que la exposición de plantas de *Arabidopsis* a radiación UV-B en la presencia de antioxidantes, causa la represión de la expresión inducida por luz UV del gen de una defensina (*Pdf1.2*) (Mackerness *et al.*, 1999). Además el H₂O₂, puede funcionar como una señal para inducir una variedad de respuestas bioquímicas y fisiológicas dentro de la célula y las plantas (Figura 2.5). En un trabajo reciente se demostró que el H₂O₂ induce la expresión de genes que codifican proteínas requeridas para la biogénesis del peroxisoma (Lopez-Huertas *et al.*, 2000). La inducción de estos genes también ocurre en respuesta al ataque de patógenos y herida (lo cual también genera H₂O₂). Los peroxisomas son fuentes de ERO y de enzimas antioxidantes, y por lo tanto, reguladores importantes del estado redox celular. (Lopez-Huertas *et al.*, 2000).

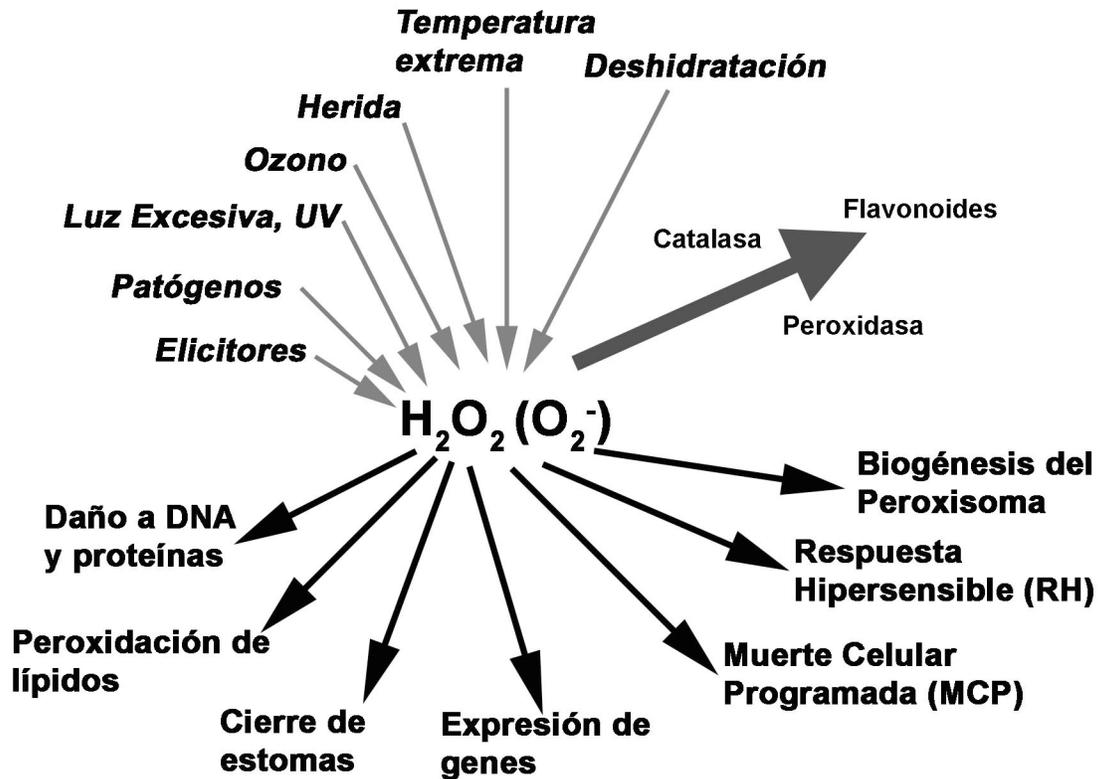


Figura 2.5. Señalización del H_2O_2 en plantas. Las flechas negras indican efectos celulares del H_2O_2 y las flechas grises representan síntesis y degradación del H_2O_2 (modificado de Neill *et al.*, 2002)

2.3.2. ERO y la defensa contra patógenos

Las ERO juegan un papel central en la defensa de las plantas hacia patógenos. Durante esta respuesta, la planta reduce sus capacidades de depurar ERO, acumulándolas y activando la RH. Lo anterior indica que se requiere de una producción coordinada de ERO y represión de mecanismos depuradores, así como de una retroregulación de los niveles elevados de ERO por los depuradores, una vez establecido el mecanismo de defensa. La inducción de la RH limita la difusión de la enfermedad desde el punto de infección. Durante reacciones incompatibles, cuando un patógeno es percibido, las respuestas de defensa, incluyendo la RH son inducidas y la producción de H_2O_2 ocurre en una manera bifásica. La inicial y muy rápida acumulación de H_2O_2 es seguida por una segunda y prolongada generación de H_2O_2 . Durante interacciones compatibles, cuando un

patógeno rebasa las líneas de defensa e infecta a la planta, sólo la primera fase de acumulación de H_2O_2 ocurre (Figura 2.6, Grant y Loake, 2000). La fase II correlaciona con el establecimiento de la resistencia a la enfermedad mientras que la fase I es una respuesta no específica a una variedad de estreses incluyendo la herida. La muerte celular tiene que ser controlada también en las regiones aledañas al sitio en donde ocurrió la RH. En esto también son fundamentales las ERO provenientes de las NADPH oxidasas AtrbohD y AtrbohF (Torres et al, 2005).

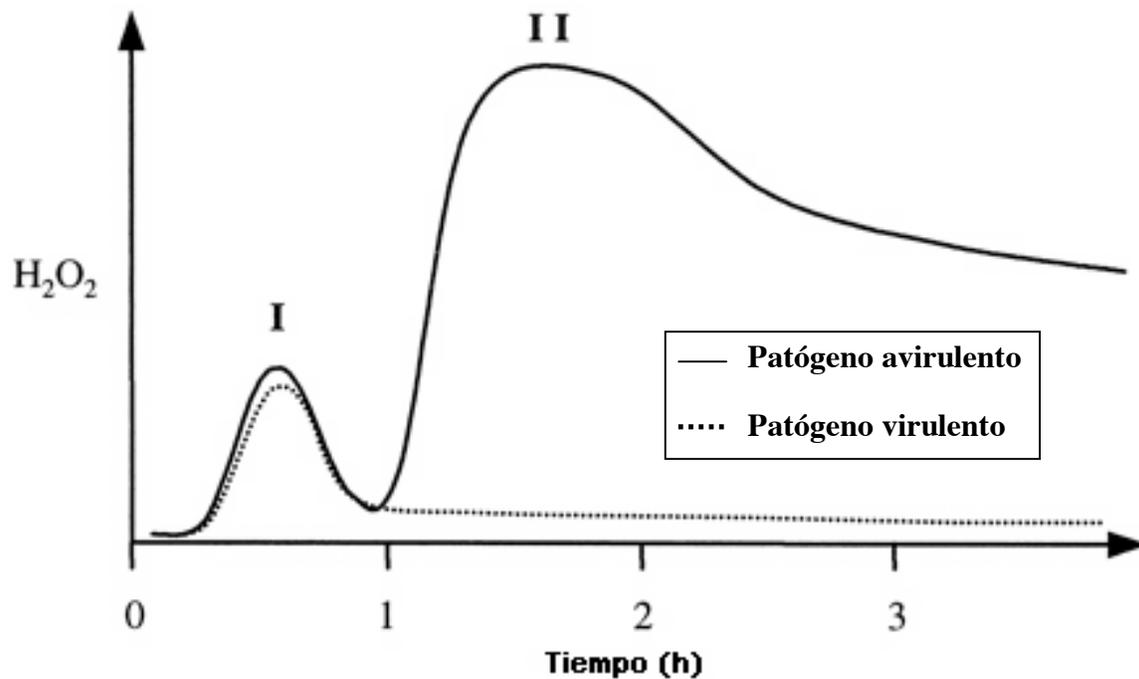


Figura 2.6. Acumulación bifásica de H_2O_2 . Durante la explosión oxidativa de la planta en respuesta a un patógeno avirulento (interacción incompatible) o virulento (interacción compatible), únicamente la fase II correlaciona con el establecimiento de la resistencia a la enfermedad. La fase I es una respuesta no específica a un número de estreses incluyendo la herida (modificado de Grant y Loake, 2000).

2.3.3. Reguladores negativos del transporte polar de auxinas

La fitohormona auxina, es sintetizada localmente en el meristemo apical del tallo, en los primordios de las hojas y en las semillas en desarrollo, así como en los tejidos de la raíz (Ljung *et al.*, 2005). Una vez sintetizada es movilizadada a los tejidos subapicales de

manera polar por un mecanismo denominado transporte polar de auxinas (TPA). El TPA se lleva a cabo de célula a célula y tiene un carácter estrictamente unidireccional, principalmente desde el ápice hacia la base de la planta. En el TPA ambos sistemas, influjo y eflujo están involucrados en el transporte unidireccional de auxinas. En la raíz, el movimiento de las auxinas es bidireccional: el transporte acropetalo se lleva a cabo desde la zona de transición entre la raíz y el hipocotilo (ZT) hacia la punta de la raíz a través del cilindro central a lo largo de toda la raíz, mientras que el transporte basipetalo ocurre en las capas celulares exteriores de la punta hacia la ZT (Muday y DeLong, 2001). El gen AUX1 codifica una permeasa de aminoácidos identificada como un acarreador del influjo de auxinas (Marchant *et al.*, 1999). En *Arabidopsis*, se han propuesto varios componentes como partes del sistema de eflujo de auxinas, entre los que destaca el gen AtPIN1 el cual muestra similitud con un grupo de transportadores bacterianos (Galweiler *et al.*, 1998). Se ha demostrado que varios flavonoides pueden regular negativamente el transporte polar de auxinas *in vivo* (Buer y Muday, 2004), debido a que son capaces de inhibir el eflujo de auxinas y desplazar al inhibidor del eflujo de auxinas, el ácido 1-naftiltalámico (NPA) en fracciones membranales (Jacobs y Rubery, 1998).

Murphy *et al.* (2000) colocalizaron en *Arabidopsis* a los flavonoides con aminopeptidasas, ambos tipos de moléculas involucradas como reguladores del eflujo de auxinas. El flavonoide quercetina fue localizado en los cotiledones, la parte superior del hipocotilo y la zona de transición entre la raíz y el hipocotilo. Naringenina chalcona, fué detectada en la zona de elongación distal de la raíz y el camferol fué localizado en la cofia. Por otra parte, plantas mutantes deficientes en la síntesis de flavonoides denominadas testa transparente (*tt*), mostraron además de los niveles reducidos de flavonoides en toda la planta, un exceso de un precursor de flavonoides que se acumuló en las mismas regiones donde los flavonoides se encuentran normalmente (Peer *et al.*, 2001). Asimismo, el transporte de auxinas está elevado en plántulas *tt4* y este aumento fué revertido por tratamiento con naringenina (Brown *et al.*, 2001). Los flavonoides también han sido implicados como reguladores endógenos del flujo basipetalo de auxinas en tumores inducidos por *Agrobacterium tumefaciens* (Schwalm *et al.*, 2003). Las

isoflavonas, formononetina y medicarpina se localizaron en las células de los tumores junto con concentraciones elevadas de auxinas fueron encontradas.

2.4. Las fitohormonas en la defensa de las plantas

2.4.1. Las Oxilipinas (Acido Jasmónico y Acido 12-oxo-fitodienoico)

El JA se encuentra presente en toda la planta, con mayor concentración en tejidos en crecimiento como ápices de tallos, hojas jóvenes, frutos inmaduros y extremos de raíces. Es derivado del ácido linolénico (un ácido graso no saturado), liberado desde los fosfolípidos de membrana por acción de lipasas. El ácido linolénico, por una serie de pasos que incluyen lipoxidación, ciclización y β -oxidación se transforma en el ácido 7-isojasmónico, que en condiciones naturales se isomeriza y se transforma en JA. La estructura química de las prostaglandinas es bastante similar a la del JA, habiéndose sugerido que ambos sistemas provienen de un origen ancestral común y que habrían evolucionado a través de millones de años (Bergey *et al.*, 1996 ;Wasternack y Parthier, 1997).

La aplicación exógena de JA produce efectos variados sobre las plantas, entre los que se encuentran, la inhibición de la elongación de las raíces, promoción de la biosíntesis del etileno, senescencia y abscisión de hojas, estimulan el cierre de estomas en condiciones de estrés y aumentan la resistencia de las plantas a la infección por patógenos.

2.4.2. El papel de las oxilipinas en la defensa

El JA es considerado uno de los componentes de la vía de transducción de señales en los mecanismos de defensa y se han registrado aumentos en sus niveles endógenos en plantas sometidas a estrés. La señal del JA es probablemente mediada por la activación de receptores, aunque hasta la fecha no se ha identificado ninguno (Turner *et al.*, 2002)

El JA induce la expresión de genes que codifican proteínas específicas, entre las que

pueden citarse inhibidores de proteasas, enzimas involucradas en la biosíntesis de flavonoides, osmotinas, lipoxigenasas y diferentes proteínas relacionadas a patogénesis. La ruta de los fenilpropanoides (en especial las enzimas PAL y ChS) ha sido muy estudiada en plantas, especialmente con respecto a la biosíntesis de fitoalexinas en respuesta a patógenos y elicitors de hongos, hay evidencias que sugieren que el JA juega un papel clave en esta respuesta (Gundlach *et al.*, 1992). La síntesis localizada de JA o su liberación en respuesta a herida puede estimular a la lipoxigenasa, un paso regulatorio en la biosíntesis de JA y otras enzimas de la vía de biosíntesis de JA. La inducción de las lipoxigenasas sugiere la posibilidad de un mecanismo de amplificación de la señal estimulando de esta forma otras vías de defensa más efectivamente. A pesar de que se ha sugerido que la síntesis de JA requiere de la lipoxigenasa más abundante en cloroplasto, *LOX2* (Bell *et al.*, 1995), y que al parecer al menos en cebada actúa sobre ácidos grasos libres, principalmente ácido linolénico (Bachmann *et al.*, 2002), se ha demostrado que en respuesta a herida la lipoxigenasa actúa sobre lípidos localizados en el cloroplasto y no sobre ácidos grasos libres (Buseman *et al.*, 2006). Además de la inducción de lipoxigenasas, en hojas de tomate, por ejemplo, el JA activa la expresión de genes que codifican enzimas de la biosíntesis de inhibidores de proteasas (Farmer y Ryan, 1992). Estas proteínas intervienen en la defensa de las plantas contra patógenos, herbívoros y estrés físico y químico.

Por otra parte, se ha demostrado que el precursor de la biosíntesis del JA, el ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA) es una molécula biológicamente activa, ya que sus niveles se incrementan en respuesta a la aplicación de un elicitor (Müller *et al.*, 1993), además éste compuesto tiene la capacidad de inducir la expresión de genes de defensa y la acumulación de fitoalexinas en ausencia de JA (Blechert *et al.*, 1995). Utilizando un sistema de microarreglos, se demostró que el OPDA no sólo induce genes dependientes del gen insensible a coronatina (*COII*), los cuales son inducidos por JA, sino que también son inducidos genes independientes de *COII* que no responden a JA (Stinzi *et al.*, 2001), sugiriendo que el OPDA puede funcionar cooperativamente con el JA para regular la expresión de genes de defensa. En este sentido, Taki *et al.* (2005), demostraron que una

vía de señalización mediada por OPDA, independiente de la señalización de JA, es requerida para la respuesta a herida en *Arabidopsis*.

2.4.3. Etileno

El etileno es el compuesto insaturado más sencillo en la naturaleza. Se produce en casi todos los órganos de las plantas superiores, aunque la tasa de producción depende del tipo de tejido y de su estadio de desarrollo. En general, las regiones meristemáticas y nodales son las más activas en la biosíntesis. Sin embargo, la producción también se incrementa durante la abscisión foliar, senescencia de las flores y maduración de frutos.

El etileno se sintetiza a partir del aminoácido metionina, que por acción de una adenosil-metionina sintetasa genera adenosil-metionina (AdoMet). La etapa limitante en la ruta es la conversión de AdoMet en ACC, catalizado por la ACC sintasa (Kende, 1993). Su biosíntesis se incrementa en plantas expuestas a condiciones ambientales de estrés y en la presencia de JA. El etileno es considerado la hormona de la maduración y favorece la epinastia de hojas. La epinastia es la curvatura hacia abajo de las hojas debido a que el lado superior del pecíolo (adaxial) crece más rápido que el inferior (abaxial). Además, inhibe el crecimiento de la raíz y favorece la formación de raíces adventicias, induce la senescencia de las hojas así como la abscisión de hojas y frutos. Se ha demostrado que la fitohormona auxina estimula la formación de etileno en varios tejidos vegetales (McKeon *et al.*, 1995). En plántulas de chícharo (*Pisum sativum* L.), ambas fitohormonas, etileno y auxina están involucradas en la formación del gancho apical del hipocotilo. Se piensa que una distribución asimétrica de auxinas resulta en una síntesis incrementada de etileno en el sitio de acumulación de auxinas. Niveles elevados de etileno a su vez, inhiben el crecimiento hacia un lado resultando en la curvatura del hipocotilo (Peck *et al.*, 1998).

En *Arabidopsis*, después de su síntesis, el etileno es percibido por una familia de cinco receptores (ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 y EIN4), localizados en la membrana, que presentan actividad histidina cinasa y capacidad autofosforilante (Hall *et al.*, 2000). La unión del etileno a su receptor induce su autofosforilación a nivel de residuos de histidina

y luego transfiere estos fosfatos hacia residuos de aspartato. El receptor, así activado, inicia una cascada de señalización hacia otras proteínas efectoras (Hall *et al.*, 2000). Mutaciones dominantes en cada uno de los receptores confiere insensibilidad al etileno sugiriendo su participación en la percepción, tal es el caso de la mutante dominante *etr1*, la cual está reprimida en todas las respuestas al etileno (Zhao *et al.*, 2002)

2.4.4. Participación del etileno en la defensa de las plantas

El papel del etileno en la respuesta de defensa, se basa en que sus niveles aumentan en respuesta a herida, principalmente como un resultado del incremento en la síntesis de su precursor ACC (Watabe *et al.*, 2001). Además, se ha demostrado que el etileno es capaz de potenciar la acción del JA bajo esta situación de estrés (O'Donnell *et al.*, 1996). Pero no sólo el estrés abiótico resulta en la formación de etileno sino que el estrés biótico provocado por la infección de hongos y bacterias, también resulta en acumulación de etileno, el cual puede inducir la producción de fitoalexinas para combatir la infección. Se ha reportado además, que la síntesis del etileno inducida por ozono, luz UV y herida está involucrada en la generación de ERO y se ha sugerido al etileno como un regulador central de la muerte celular programada (MCP) en plantas (Mergemann y Sauter, 2000).

2.4.5 El papel de las auxinas en la defensa de las plantas.

Además del sistema de defensa inducido por los factores de avirulencia (ver sección 2.1.2), las plantas tienen un sistema basal de inmunidad que no promueve la muerte celular, pero si activa mecanismos de defensa. Este sistema de inmunidad basal es inducido por moléculas producidas por los patógenos denominadas “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMPs, por sus siglas en inglés). Uno de los PAMPs mejor estudiados es la flagelina, y un péptido derivado de ésta denominado flg22. La percepción de flg22 por su receptor en la célula vegetal induce la generación de ERO, la activación de MAP cinasas y la inducción de genes de defensa (Zipfel *et al.*, 2004). Recientemente se reportó que flg22 induce un aumento en los niveles de un microRNA (miR393), el cual regula negativamente a los mensajeros para las proteínas

con caja F denominadas TIR1, AFB2 y AFB3 (Navarro et al., 2006). Estas proteínas además de ser receptoras de auxinas, promueven la degradación de proteínas que funcionan como reguladores negativos de la transcripción de genes que responden a auxinas. Esto implica que la supresión de la señalización mediada por auxinas es necesaria para la resistencia a los patógenos bacterianos

2.5. Interacciones hormonales

La respuesta de una planta a cualquier estímulo exógeno o endógeno nunca es el resultado de la activación de una única ruta de señalización hormonal, sino que es la consecuencia de una compleja red de interacciones entre distintas vías de señalización. Las respuestas específicas a un estímulo inicial son derivadas de la activación de las complejas vías de señalización y de sus interacciones. Existen evidencias de que la célula es capaz de combinar de formas distintas las mismas rutas hormonales para determinar respuestas muy específicas a diferentes estímulos. La respuesta de las plantas a patógenos y herida es un ejemplo de la interacción entre diferentes vías de señalización. A pesar de que en ambos casos la planta activa las vías de señalización de JA y de etileno, éstas se combinan de diferentes formas para que las respuestas finales sean distintas y específicas para cada estímulo.

Las vías de señalización hormonal no son independientes y lineales, los procesos de regulación de la estabilidad de proteínas por ubiquitinación constituyen un mecanismo central de control de la señalización hormonal en plantas, común a casi todas las vías de señalización hormonales descritas, y en algunos casos explica como se regula molecularmente la interacción entre dos vías (Gazzarrini y McCourt, 2003).

2.5.1. La vía de señalización del JA

Varios componentes están involucrados en la señalización del JA, uno de ellos, la proteína codificada por el gen *COII*, contiene un motivo con caja F. Debido a que proteínas con caja F participan en la formación de complejos ubiquitina-ligasa del tipo

SCF, se ha sugerido la participación de la degradación de proteínas por el proteosoma, como un mecanismo de regulación de la señalización de JA (Xie *et al.*, 1998). La mutante *coil-1* exhibe una insensibilidad completa a JA en ensayos de inhibición del crecimiento de la raíz y acumulación de antocianinas mediados por JA (Feys *et al.*, 1994). Mutantes deficientes en otros componentes de complejos SCF también muestran deficiencias en la señalización de JA (Xu *et al.*, 2002; Devoto *et al.*, 2002; Feng *et al.*, 2003). Recientemente, se identificó un homólogo de COI1 en tomate (*LeCOI1*), lo cual demuestra que su función está conservada en otras especies (Li *et al.*, 2003).

Además de *coil* se han descrito otras mutantes insensibles a JA, aunque éstas muestran un fenotipo más débil que *coil* lo cual sugiere que los genes correspondientes no se requieren para todas las repuestas a JA, y/o que estas mutaciones afectan a miembros de familias génicas con funciones parcialmente redundantes. La mutante *axr1* se identificó originalmente como insensible a auxinas y recientemente se ha mostrado que también es insensible a JA (Xu *et al.*, 2002; Tiryaki y Staswick, 2002). La proteína AXR1 participa en la regulación de la actividad de las ubiquitina-ligasas tipo SCF relacionadas con la señalización de auxinas y de luz (Del Pozo y Estelle 1999; Feng *et al.*, 2003), lo que también apoya la implicación de este tipo de enzimas en la señalización de JA. La mutante *cos1* (supresor de *coil*) fué identificada mediante un escrutinio de mutaciones supresoras del fenotipo de la mutante *coil* (Xiao *et al.*, 2004). La mutante *cos1* devuelve la capacidad de responder a JA a las mutantes *coil* en diversos procesos regulados por esta hormona como son el crecimiento de la raíz, la senescencia y la defensa. *COS1* codifica para una enzima involucrada en la síntesis de riboflavina, por tanto esta vitamina estaría involucrada en la vía de señalización del JA (Xiao *et al.*, 2004).

El JA, al igual que cualquier otra fitohormona, no participa de manera aislada en la activación de los procesos que regula, sino que lo hace interaccionando con otras moléculas señalizadoras. Se ha descrito un amplio número de interacciones entre el JA y otras vías de señalización como la del etileno, SA, auxinas o ácido abscísico (Turner *et al.*, 2002; Rojo *et al.*, 2003).

2.5.2. Interacción con etileno

El JA y el etileno cooperan o antagonizan en la regulación de diferentes respuestas a estrés, incluyendo la defensa contra patógenos, herida (mecánica o biótica), ozono y desarrollo exagerado del gancho apical del hipocotilo (Turner *et al.*, 2002; Rojo *et al.*, 2003). La interacción, positiva o negativa, que se establece entre estas dos vías de señalización es lo que determina la respuesta más adecuada a cada uno de estos estímulos. El JA y el etileno actúan sinérgicamente en la activación de la expresión de genes de defensa en respuesta a patógenos necrotróficos induciendo la expresión de genes tales como el gen *Pdf1.2* (Xu *et al.*, 1994; Penninckx *et al.*, 1998). Mutantes afectadas en la síntesis o percepción de cualquiera de estas dos fitohormonas son incapaces de inducir estas respuestas de defensa y son más susceptibles al ataque de los patógenos (Knoester *et al.*, 1998; Vijayan *et al.*, 1998; Staswick *et al.*, 1998; Thomma *et al.*, 1999). Sin embargo, en respuesta a herida provocada por hervíboros o daño mecánico estas dos vías de señalización antagonizan en la activación de la respuesta de defensa (Rojo *et al.*, 2003).

El gen *ERF1* (Ethylene-Response-Factor1) es un elemento clave en la activación de los mecanismos de defensa de la planta frente a patógenos, este gen, codifica un factor de transcripción de respuesta inmediata a etileno que participa en una cascada de activación transcripcional de genes inducibles por esta hormona (Solano *et al.*, 1998). En respuesta a la infección con el patógeno necrotrófico *Botrytis cinerea*, la expresión del gen *ERF1* se induce después de la infección y regula *in vivo* la expresión de genes de defensa como *Pdf1.2* o quitinasa (*b-CHI*) (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002). En *Arabidopsis*, el factor de transcripción *ERF1* además de participar en la señalización de etileno, es también un elemento clave en la respuesta a JA y se ha demostrado que juega un papel importante en la integración de ambas señales para la activación de mecanismos de defensa (Lorenzo *et al.*, 2003). Al igual que en el caso de *Pdf1.2* (Penninckx *et al.*, 1998), la expresión de *ERF1* se induce por tratamiento con JA y etileno y esta inducción depende de ambas hormonas ya que en mutantes *ein2* (insensibles a etileno) y *coi1* (insensibles a JA) se abate dicha inducción. Estos datos explican la cooperación de estas dos señales en la

activación de los genes de defensa regulados por *ERF1* y el requerimiento de la activación de las señales de etileno y JA simultáneamente (Lorenzo *et al.*, 2003). El factor transcripcional ORCA3 regula las respuestas dependientes de JA a través de un elemento de respuesta a JA y elicitores (JERE) en *Catharanthus roseus*. El factor transcripcional ORCA3 es muy similar a ERF1 y JERE es muy similar al sitio de unión a DNA de ERF1 (caja GCC). Esto último sugiere que los genes ORCA podrían tener en *C. roseus* un papel similar al de ERF1 en *Arabidopsis*. (Menke *et al.*, 1999; Van der Fits y Memelink, 2000).

Por otra parte, el gen AtMYC2 es un factor transcripcional de tipo bHLHzip localizado en el núcleo celular (Lorenzo *et al.*, 2004). Se le ha descrito como un regulador positivo de la expresión de genes de respuesta a herida y negativo de la expresión de genes de respuesta a patógenos. Este efecto es antagónico al de ERF1, que regula positivamente la expresión de genes de respuesta a patógenos y tiene un efecto negativo en la expresión de genes de respuesta a herida (Lorenzo *et al.*, 2004). Lo anterior demuestra la existencia de dos ramificaciones en la ruta de señalización de JA reguladas diferencialmente por AtMYC2 y ERF1, que explican la interacción molecular entre las vías de JA y etileno en la activación de la defensa.

2.5.3. Interacción con SA

En respuesta a la infección por un patógeno, las vías de señalización de SA y etileno/JA interaccionan tanto antagónica como sinérgicamente en la inducción de las respuestas de defensa de las plantas. Entre las interacciones antagónicas que se han descrito, se ha demostrado que el SA es capaz de inhibir la síntesis y activación de genes de respuesta a JA y etileno en la respuesta a herida (Niki *et al.*, 1998; O'Donnell *et al.*, 1996). Además, el tratamiento con JA inhibe la expresión mediada por SA de algunos genes relacionados a patogenicidad (*PR*) (Niki *et al.*, 1998). Mutantes afectadas en la acumulación y en la respuesta a SA exhiben una elevada expresión de genes regulados por etileno/JA, la cual puede ser revertida adicionando ácido isonicotínico, que es un inductor de la señalización de SA. Plantas transgénicas que sobre-expresan el gen *ERF1* muestran una reducción en

la tolerancia al patógeno *Pseudomonas syringae*, indicando que la sobre-expresión de la señalización de etileno/JA mediada por *ERF1* tiene un efecto negativo en la tolerancia dependiente de SA a *P. syringae* (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002).

Por otra parte, en *Arabidopsis* se ha demostrado que el factor de transcripción específico de plantas, *WRKY70*, actúa como un activador de los genes inducidos por SA y represor de los genes de respuesta a JA, ya que la modulación de la expresión de *WRKY70* alteró la resistencia a patógenos virulentos mediante la activación de la expresión de genes relacionados a la RSA y la represión de genes de respuesta a JA (Li *et al.*, 2004). Adicionalmente, la cooperación entre las vías dependientes de SA y de etileno/JA se ha demostrado con plantas infectadas con *Alternaria brassicicola* o tratadas con JA, etileno o SA, en donde el efecto de estas fitohormonas es de cooperación más que de antagonismo en la activación de la defensa en contra de este patógeno (Schenk *et al.*, 2000).

Resultados obtenidos anteriormente en nuestro grupo indican que la acumulación del transcrito de las primeras enzimas de la biosíntesis de flavonoides en frijol (PvACCasa y ChS) fué inducida por el tratamiento con *P. syringae pv tabaci*, con un elicitor de levadura y con MeJA. Estos datos sugieren una regulación coordinada de los primeros pasos en la biosíntesis de flavonoides. Además tratamientos con inhibidores específicos sugieren que el etileno y las oxilipinas son necesarias para la inducción del gen de la PvACCasa en respuesta al ataque por *P. syringae pv tabaci* (García-Ponce y Rocha-Sosa, 2000). En base a estos datos, para nosotros resulta interesante conocer los factores genéticos involucrados en la regulación del gen de la PvACCasa en respuesta a diferentes condiciones de estrés debido a su papel clave en la biosíntesis de flavonoides.

3. Hipótesis y objetivos

3.1 Hipótesis

El gen de la PvACCasa es inducido por vías de señalización dependientes de JA y etileno en plantas superiores.

3.2 Objetivo General

Conocer los factores necesarios en la regulación de la actividad del promotor del gen de la ACCasa de frijol bajo diferentes estímulos.

3.3 Objetivos específicos

- Determinar la región promotora de la ACCasa de frijol
- Conocer el patrón de expresión de la PvACCasa en condiciones normales de crecimiento.
- Evaluar el patrón tejido-específico de la expresión del gen quimérico PvACCasa::GUS bajo diferentes estímulos en *A. thaliana*.
- Estudiar la participación de las vías de señalización de JA y etileno en la inducción del gen de la PvACCasa, mediante la utilización de mutantes.

4. Materiales y métodos

4.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se utilizaron plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Negro Jamapa etioladas las cuales fueron germinadas sobre una charola en un ambiente húmedo durante 10 días. *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col-0) fué el fondo genético utilizado para las plantas transgénicas y las mutantes *etr1-1* y *coi1-1*. El fondo genético de la mutante *opr3* fué el ecotipo WS. Las mutantes *coi1-1* y *opr3* fueron donadas amablemente por John G. Turner (University of East Anglia, United Kingdom) y José Sánchez-Serrano (Centro Nacional de Biotecnología CSIC, Madrid, España) respectivamente, mientras que la mutante *etr1-1* fué obtenida de The Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC). Las plantas de *Arabidopsis* utilizadas para transformación, cruza y tratamiento de herida y patógenos, fueron cultivadas en macetas con metromix-200 como sustrato y regadas con solución nutritiva (5 mM KNO₃, 2.5 mM KH₂PO₄ (ajustado a pH 6.5), 2.0 mM MgSO₄, 2.0 mM Ca (NO₃)₂, 50 μM Fe-EDTA, 70 μM H₃BO₃, 14 μM MnCl₂, 0.5 μM CuSO₄, 1 μM ZnSO₄, 0.2 μM Na₂MoO₄, 10 μM NaCl, 0.01 μM CoCl₂, pH 6.5) cada dos semanas e incubadas a 24°C con un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad. Para los ensayos *in vitro*, semillas de *Arabidopsis* fueron esterilizadas con una solución de hipoclorito de sodio al 50% (v/v) y 0.02% (v/v) de Triton X-100 por 5 minutos y enjuagadas 6 veces con agua estéril. Las semillas fueron incubadas a 4 °C al menos 2 días para romper la dormancia y proveer germinación uniforme. Las condiciones de luz y temperatura fueron iguales a las indicadas para el crecimiento en sustrato.

4.2. Identificación del promotor y clonación

Se utilizó el kit Universal Genome Walker (CLONTECH, Palo Alto, CA), en el que a partir de DNA genómico de hojas embrionarias etioladas de frijol de 10 días de edad se construyeron 7 subpoblaciones con diferentes enzimas de restricción (*Dra* I, *Eco* RV, *Pvu* II, *Stu* I, *Sma* I, *Hpa* I, *Xho* I) y se ligaron a adaptadores provistos por el kit. Utilizando

un alineamiento de las secuencias del gen de la ACCasa de soya y alfalfa reportadas se diseñaron dos oligos que se utilizaron sobre DNA genómico de frijol y mediante reacciones de PCR se obtuvo un fragmento de ~ 850 pb el cual fué clonado en el vector pKS^{+/+} y se secuenció. Al analizar esta secuencia se obtuvo una identidad del 93% con los genes de ACCasa A y B de soya y el 90% con la ACCasa de alfalfa. Con esta secuencia se diseñaron oligonucleótidos específicos del gen de la ACCasa de frijol (GSP1 y GSP2) los cuales se utilizaron junto con los oligonucleotidos de los adaptadores sobre las subpoblaciones generadas mediante reacciones de PCR (PCR primario y PCR secundario). Se realizó un alineamiento de estas secuencias y se obtuvo una identidad del 80% con respecto a la región regulatoria de la ACCasa de soya. Con el fragmento de 2716 pb obtenido de la ACCasa de frijol se construyó un gen quimérico utilizando el vector de transformación de plantas pBin121, el cual contiene un cassette del gen reportero de la β-glucoronidasa (GUS). Se diseñaron oligonucleótidos específicos de la secuencias con los sitios de restricción *Hind*III (*Hind*ACC) y *Bam*HI (*Bam*ACC) y se amplificó el fragmento para realizar una clonación dirigida en el vector (un resumen de la estrategia utilizada es mostrado en la figura 4.1)

Oligonucleótidos utilizados:

GSP1: 5' GTC TCA TTG GCC CAG CTC CTA ACA CTA CGT 3'

GSP2: 5' GAA CTT GAC TGC TGC CAT TCC ATT GTT TGC 3'

HindACC: 5' TTG AAG CTT TGA AAA ACA TGA CAC TTG T 3'

BamACC: 5' ATT GGG ATC CTT CTG TAT GTC TCC TAT GTA 3'

(Los nucleótidos subrayados indican los sitios de restricción *Hind*III y *Bam*HI, respectivamente).

Las condiciones de las reacciones de PCR fueron las siguientes:

PCR primario: 7 ciclos (94 °C, 25 seg; 72 °C, 3 min); 32 ciclos (94 °C, 25 seg; 67 °C, 3 min); 1 ciclo (67 °C, 7 min).

PCR secundario: 5 ciclos (94 °C, 25 seg; 72 °C, 3 min); 20 ciclos (94 °C, 25 seg; 67 °C, 3 min); 1 ciclo (67 °C, 7 min).

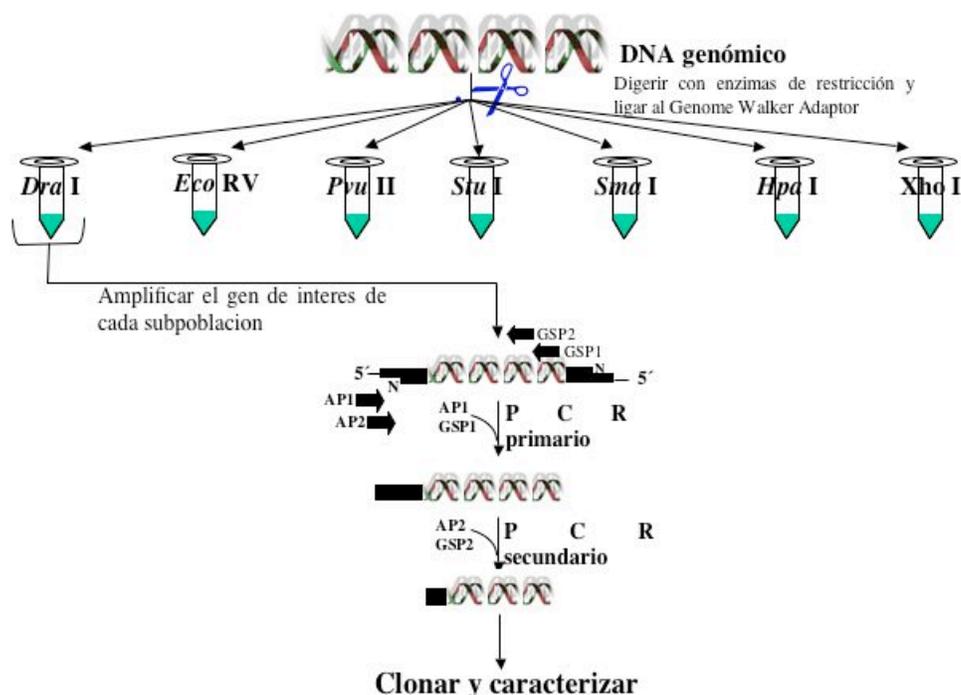


Figura 4.1. Esquema de la estrategia experimental utilizada para la obtención del promotor del gen de la PvACCasa.

4.3. Transformación de plantas de *Arabidopsis* y selección

Plantas de *Arabidopsis* fueron transformadas utilizando el método de infiltración al vacío mediado por *Agrobacterium tumefaciens* (Clough y Bent, 1998) y cultivadas en macetas con metromix-200 para la producción de semillas. Las semillas fueron colocadas en medio de germinación MS (Medio Murashige y Skoog, SIGMA) conteniendo 50 mg/l de kanamicina. A cada una de las líneas independientes obtenidas (PvACCasa::GUS), se les realizó un análisis por PCR para verificar la presencia del transgene y fueron cultivadas para la obtención de semillas. Semillas T3 homocigas, obtenidas de estas plantas, fueron utilizadas para los análisis realizados.

4.4. Generación de cruzas

Líneas mutantes homocigas en la síntesis y percepción de JA (*coi1-1* y *opr3*), así como en la percepción de etileno (*etr1-1*), fueron utilizadas para la generación de cruzas con la línea transgénica homociga PvACCasa::GUS. Debido a su fenotipo de andro estéril de la mutante *coi1-1*, cruzas con esta mutante fueron mantenidas como heterocigas. Líneas homocigas para *coi1-1* (*coi1-1*/PvACCasa::GUS) las cuales se utilizaron en todos los análisis fueron obtenidas seleccionando en medio MS suplementado con 50 μ M de MeJA. Líneas homocigas F4 en el fondo *etr1-1* (*etr1-1*/PvACCasa::GUS) fueron seleccionadas por su hipersensibilidad a glucosa y resistencia a etileno y fueron utilizadas en todos los análisis. La mutante *opr3* es andro estéril debido a que no es capaz de sintetizar JA, pero este fenotipo puede ser revertido con la adición exógena de 450 μ M de MeJA, así que líneas homocigas F3 en el fondo *opr3* (*opr3*/PvACCasa::GUS), fueron utilizadas para todos los análisis. Debido a que la mutante *opr3* se encuentra en el ecotipo WS, se generó una crusa en este ecotipo (WS/PvACCasa::GUS), para utilizarla como control. Para la generación de la doble mutante (*coi1-1/etr1-1*) se cruzaron las líneas homocigas de las cruzas de las mutantes *coi1*/PvACCasa::GUS y *etr1*/PvACCasa::GUS. Debido al fenotipo andro estéril de la mutante *coi1-1*, la doble mutante también fué mantenida como heterociga. Líneas homocigas para *coi1-1etr1-1* se utilizaron para todos los análisis.

4.5. Detección histoquímica de GUS

Los tejidos fueron incubados (sumergidos o sobre la placa de crecimiento) con una solución de tinción (1mg/ml, 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-glucoronido (X-Gluc); 100 mM NaPO₄ pH 7.2; 0.5 mM K₃Fe(CN)₆; 0.5 mM K₄Fe(CN)₆; 10 mM EDTA; 0.1% (v/v) Triron X-100) a 37 °C durante 16 h y aclarados con etanol al 80%. Las raíces fueron aclaradas de acuerdo al método de Malamy y Benfey (1997).

4.6. Hibridación *in situ* de mRNA en plantas intactas

Las sondas sentido y antisentido de los genes *AtACCI* y *PvACCasa* fueron sintetizados *in vitro* y marcados con digoxigenina de acuerdo a las especificaciones del proveedor (DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7); Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). La hibridación *in situ* de mRNA fué realizada con base en lo reportado por Friml *et al.* (2003). Plantas de frijol de 3 días de edad (cultivadas en charolas en ambiente húmedo) y de *Arabidopsis* (cultivadas en medio MS en orientación vertical) se fijaron en una mezcla de buffer de fijación (PBS 1X, 0.1% Tween, 0.08 M EGTA, 15% DMSO, 5% Formaldehído) y heptano en una relación 1:1 (v/v) durante 30 min. Se lavaron 2 veces con metanol y 3 con etanol durante 5 minutos cada uno. Las muestras fueron lavadas nuevamente con etanol:xileno (1:1, v/v) por 30 minutos y con etanol (2 veces) por 5 minutos. Después de los lavados, las muestras fueron rehidratadas con series de etanol/PBS1X al 75, 50, 25% por 10 min cada uno y fijadas en el buffer de fijación durante 20 min.

Después de la fijación, las muestras se lavaron con PBS1X 2 veces por 10 min y se trataron con proteinasa K (20 μ g/ml en PBS 1X) por 15 min a 37 °C. La reacción con proteinasa K fué interrumpida con glicina (2 mg/ml en PBS 1X) por 5 min, seguida de 2 lavados con PBS 1X/0.1% Tween 20. Las muestras se pasaron a tubos eppendorf y se prehibridaron en el buffer de hibridación (50% Formamida, 5X SSC, 0.1 mg/ml Heparina, 0.1% Tween 20, 0.1-1 mg/ml DNA esperma de salmón desnaturalizado a 85 °C por 5 min) por 1 h a 45 °C en un termomixer con agitación moderada. Las muestras se dejaron hibridando en buffer de hibridación nuevo con 20-100 ng/ml de la sonda (desnaturalizada por 5 min a 85 °C) durante 16 h a 45 °C. Después de la hibridación, las muestras fueron lavadas a 50 °C: 3 veces con 50% Formamida, 2X SSC, 0.1% Tween 20 durante 10, 60 y 20 min, una vez con 2X SSC, 0.1% Tween 20 por 20 min y una vez con 0.2X SSC, 0.1% Tween 20 por 20 min. Se realizaron tres últimos lavados con PBS 1X/0.1% Tween por 10 min. Posteriormente, se bloqueó por 90 min. en el buffer de bloqueo (PBS 1X, 0.1% Tween 20, 1% BSA) y se incubó con el anticuerpo anti-DIG acoplado a fosfatasa alcalina en una dilución 1:2000 en el buffer de bloqueo durante toda la noche a 4 °C con agitación moderada. Después de la incubación con el anticuerpo, le

siguieron ocho lavados de 20 min. cada uno con PBS 1X/0.1% Tween y se incubó en el buffer de fosfatasa alcalina (0.1 M Tris-HCl pH 9.5, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl, 0.1% Tween 20) suplementado con 2 mM de levamisol a 37 °C por 10 min. Para la detección, se utilizó en el buffer de fosfatasa alcalina suplementado con 2 mM levamisol y se observó al microscopio (5-60 min). La reacción fué parada al observar diferencias con PBS 1X/0.1% Tween por 2 veces y se montaron las muestras en portaobjetos con glicerol al 50%. Las raíces fueron observadas en un microscopio estereoscópico Eclipse E600 y un microscopio óptico equipados con una cámara digital E995 (NIKON).

4.7. Transformación de raíces de frijol

Raíces transgénicas de frijol fueron generadas por la Biol. Patricia Rueda de acuerdo al protocolo reportado por Estrada-Navarrete *et al.* (2006). Semillas de frijol fueron esterilizadas y germinadas sobre una charola en un ambiente húmedo durante 2 días y transferidas a macetas con vermiculita, dejándolas crecer por 3 días más. La cepa de *Agrobacterium rhizogenes* K599 llevando la construcción PvACCasa-pBin121 (2716 pb del promotor del gen de la PvACCasa fusionado a GUS) y el vector pBin121 fueron utilizadas para la transformación de las raíces. Esta cepa fue incubada durante 2 días a 28 °C sobre placas de LB conteniendo 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de Kanamicina. El cultivo de cuatro cajas fue resuspendido con agua estéril y utilizado para inocular las plántulas con una jeringa insulínica directamente sobre los nodos cotiledonales (adicionando de 1-2 gotas por herida). Las plántulas inoculadas se dejaron crecer tapadas con un domo para mantener la humedad alta durante 12-15 días. Al cabo de este tiempo las raíces generadas fueron analizadas para la expresión de GUS.

4.8. Tratamientos

La herida mecánica fué realizada con pinzas de disección en la mitad de hojas de la roseta de plantas de 5-6 semanas e incubadas por 6 h. Para el tratamiento de patógenos una suspensión de 1×10^8 ufc de la cepa DC3000 *Pseudomonas syringae* pv *tomato* avr *RPM1* y una solución de 10 mM de MgCl₂, ambas conteniendo 0.02% de silwett L-77

fueron asperjadas sobre las hojas de la roseta de plantas de 5-6 semanas. Para los tratamientos químicos, plántulas fueron cultivadas verticalmente sobre filtros de tela durante 8 días y fueron traspasadas a medio fresco conteniendo: ninguna adición (control), 100 μM de MeJA, 50 μM de OPDA, 200 μM ACC, 1 μM IAA, 1 mM H_2O_2 , 10 mM EGTA, 10 mM EGTA/100 μM de MeJA y 10 mM EGTA/200 μM de ACC. El tiempo de incubación bajo todos estos tratamientos fué de 6 h.

5. Resultados

5.1. Obtención de la región promotora de la ACCasa citosólica de frijol

Análisis tipo southern-blot sugiere la existencia de un solo gen de la ACCasa citosólica (ACCasa) en el genoma de frijol (García-Ponce y Rocha-Sosa, 2000), por lo que para clonar la región promotora de la ACCasa, subpoblaciones de DNA fueron preparados a partir de DNA genómico de frijol utilizando el kit Universal Genome Walker (CLONTECH, Palo Alto, CA), la estrategia experimental utilizada fué resumida en la figura 4.1, en la sección de materiales y métodos.

Utilizando un alineamiento de las secuencias del gen de la ACCasa de soja y alfalfa reportadas se diseñaron dos oligonucleótidos de la region codificante que se utilizaron sobre DNA genómico de frijol y mediante reacciones de PCR se obtuvo un fragmento de > 800 pb (Figura 5.1) el cual fué clonado en el vector pBluescriptKS⁺ y se secuenció.

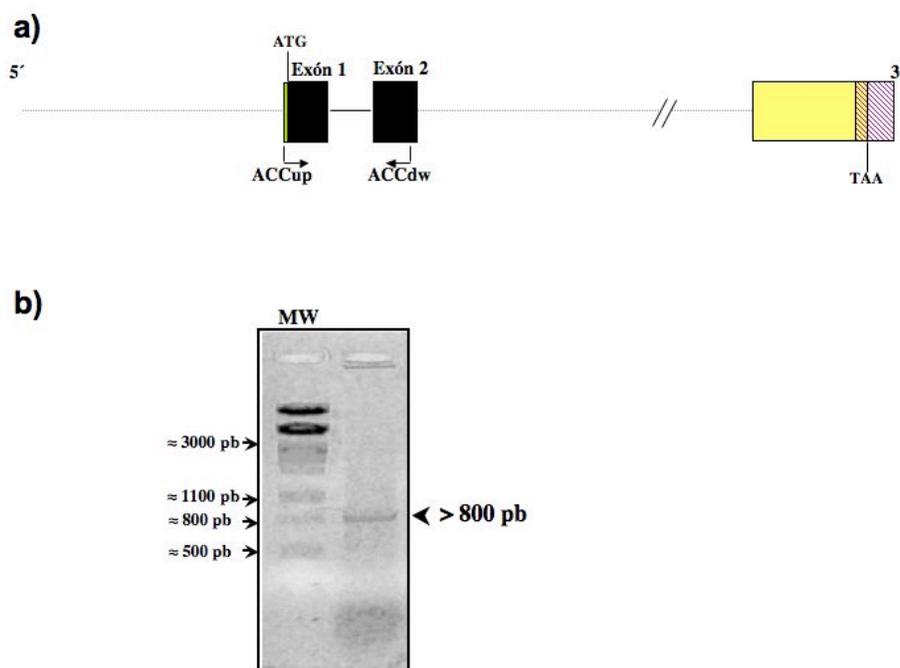


Figura 5.1. Obtención de un fragmento de la región codificante del gen de la PvACCasa. a) Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar la region codificante. b) Fragmento obtenido a partir de DNA genómico de frijol mediante reacciones de PCR. MW, Marcador de peso molecular Lambda/*Pst* I

Al analizar esta secuencia se obtuvo una identidad del 93% con los genes de ACCasa A y B de soja y el 90% con la ACCasa de alfalfa. Con esta secuencia se diseñaron oligonucleótidos específicos (GSP1 y GSP2) del gen de la ACCasa de frijol (PvACCasa) los cuales se utilizaron junto con los oligonucleótidos de los adaptadores (AP1 y AP2) en reacciones de PCR sobre las subpoblaciones generadas. En la figura 5.2 se muestra la obtención de dos fragmentos de PCR en las subpoblaciones DraI y HpaI. Al clonar estos fragmentos tanto en los vectores pBluescriptKS⁺ (pKS⁺) y TOPO se obtuvieron cuatro fragmentos traslapantes de la región promotora de la PvACCasa. Un alineamiento de estas secuencias arrojó una identidad del 90 % con respecto a la región regulatoria de la ACCasa de soja y un 89 % con respecto a la de alfalfa (Figura 5.3).

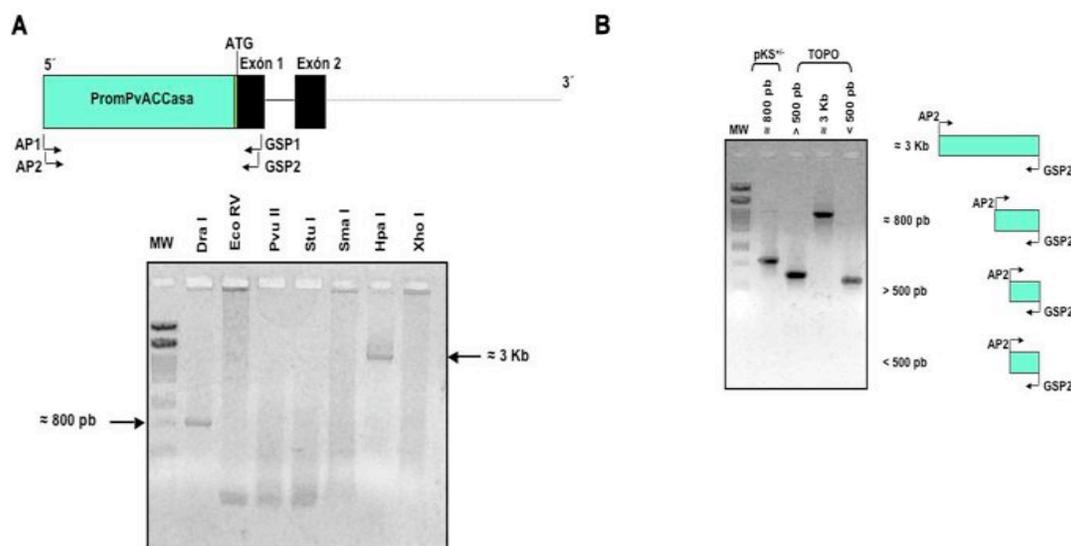


Figura 5.2. Fragmentos obtenidos de la región promotora del gen de la PvACCasa. A) Fragmentos derivados del PCR secundario de las subpoblaciones generadas con enzimas de restricción a partir de DNA genómico de frijol. B) Clonación de los fragmentos obtenidos con los pares de oligonucleótidos indicados en los vectores pBluescriptKS⁺ (pKS⁺) y TOPO.

Para asegurarnos que realmente los fragmentos correspondían a secuencias en el genoma de frijol y que no fueran artefactos generados por el PCR se realizó un southern genómico (Figura 5.4) sólo para uno de los fragmentos (el de mayor tamaño) y determinamos que efectivamente correspondía este fragmento a la secuencia de frijol.

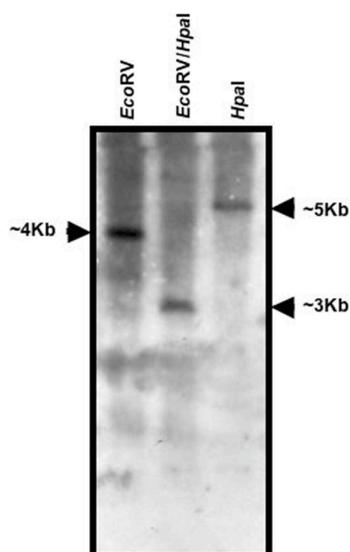


Figura 5.4. Análisis tipo southern de DNA genómico de frijol. DNA genómico de frijol (20 μ g) fué digerido con las enzimas de restricción mostradas en la parte superior de la figura, resuelto en un gel de agarosa al 0.8 % y transferido a una membrana de nylon e hibridada con un fragmento de 3Kb correspondiente a la región promotora del gen de la PvACCasa obtenida. Las flechas indican los pesos moleculares correspondientes a cada fragmento.

5.2. Construcción de genes quiméricos y generación de plantas transgénicas.

Para estudiar el patrón de expresión tejido-específico de la región promotora de la PvACCasa bajo diferentes condiciones de estrés construimos, con los fragmentos obtenidos de la PvACCasa, genes quiméricos en un vector de transformación binario de plantas (pBin121), el cual contiene un cassette del gen reportero de la β -glucoronidasa (GUS). Solamente para la clonación del fragmento mayor de la región promotora, se diseñaron oligonucleótidos específicos de la secuencia con los sitios de restricción *Hind*III y *Bam*HI y se amplificó el fragmento para realizar una clonación dirigida en el vector. La estrategia de clonación utilizada para clonar los fragmentos en el pBin121 y las construcciones obtenidas son resumidas en la figuras 5.5 y 5.6 respectivamente.

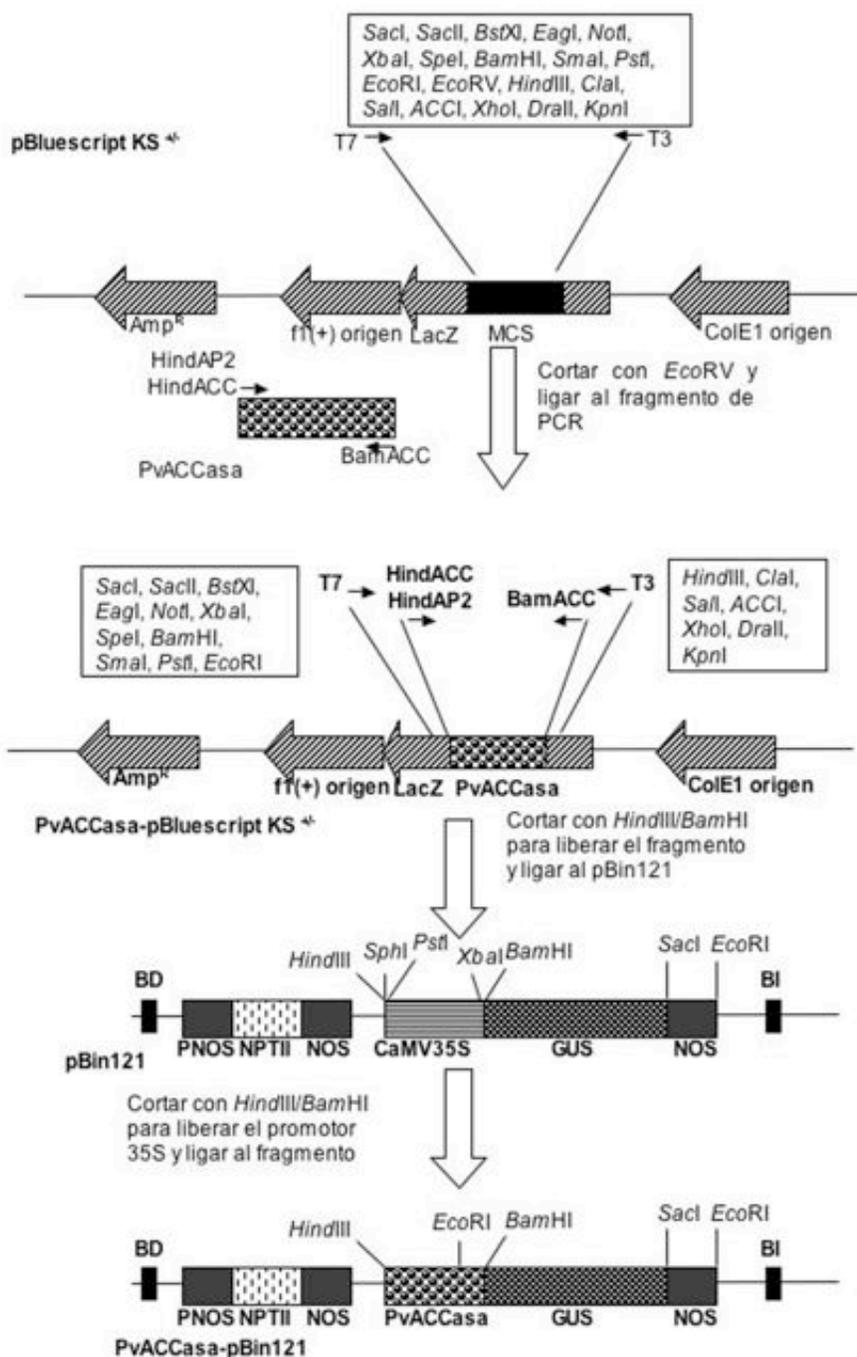


Figura 5.5. Estrategia de clonación de los fragmentos del promotor del gen de la PvACCasa. HindACC y BamACC, son los oligonucleótidos utilizados para amplificar el fragmento mayor. HindAP2 y BamACC son los oligonucleótidos utilizados para amplificar los 3 fragmentos restantes.

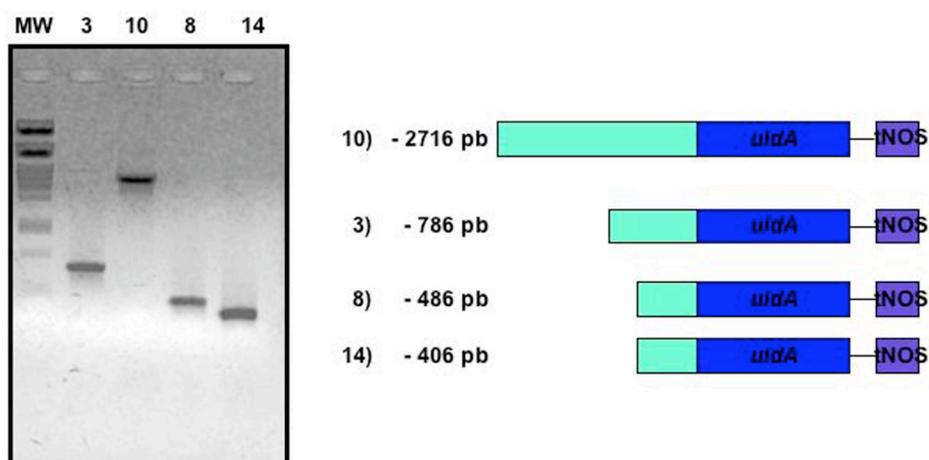


Figura 5.6. Esquema de los fragmentos del promotor del gen de la PvACCasa fusionados al gen reportero GUS. Los fragmentos correspondientes a la región de control de la PvACCasa se fusionaron al gen reportero de la β -glucoronidasa, GUS (*uidA*) en el vector binario de transformación pBin121 y utilizados para la generación de plantas transgénicas de *Arabidopsis*. Los números 3, 10, 8 y 14 representan las clonas portando cada una de las construcciones.

Las plantas de *Arabidopsis* fueron transformadas con estas construcciones utilizando el método de infiltración mediado por *Agrobacterium tumefaciens* (Clough y Bent, 1998) y se determinó por análisis de PCR la presencia del transgene en 11, 10, 7 y 7 líneas independientes para las construcciones conteniendo 2716, 786, 406 y 486 pb de la región promotora, respectivamente. Plantas homocigas T3 de cada región promotora fusionada a GUS fueron analizadas para evaluar su inducción. Como se observa en la figura 5.7, solamente las líneas que contienen 2716 pb de región promotora fueron capaces de mostrar actividad de GUS cuando estas plántulas fueron sumergidas únicamente en la solución de tinción. Estos resultados demuestran que para ser funcional el promotor de la PvACCasa se requieren de más de 786 pb de región promotora. De esta forma, los análisis que se describen posteriormente fueron llevados a cabo con las líneas que contienen 2716 pb de región regulatoria (PvACCasa::GUS).

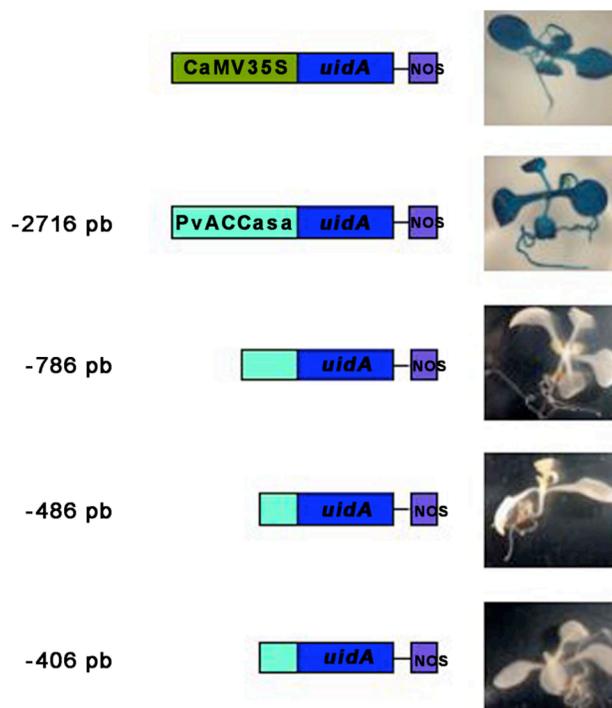


Figura 5.7. Expresión de GUS en líneas transgénicas de *Arabidopsis* conteniendo diferentes fragmentos del promotor del gen de la PvACCasa. Plántulas de 18 días fueron sumergidas 16 h en la solución de tinción, la fusión con el promotor constitutivo (CaMV35S) fué utilizado como control positivo. *uidA*, gen de la β -glucuronidasa (GUS).

Como se mostró anteriormente, el promotor del gen de la PvACCasa es fuertemente inducido por inundación, de esta forma limita los análisis de respuesta a estrés. Debido a lo anterior, adicionamos la solución de tinción sobre la placa del medio de crecimiento de las plantas, para eliminar el efecto de la inundación y obtener la actividad de GUS sólo en los sitios donde se expresa el promotor de la PvACCasa (Figura 5.8).

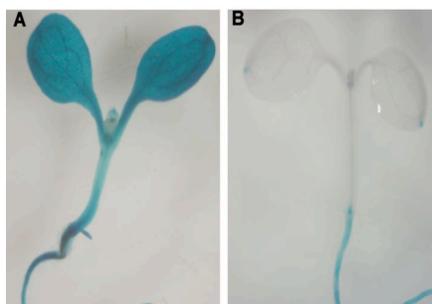


Figura 5.8. Efecto de la inundación sobre la expresión del promotor del gen de la PvACCasa. Análisis histoquímico de plántulas de 7 días: A) sumergidas en la solución de tinción y B) solución de tinción adicionada sobre la placa de crecimiento.

5.3. Análisis teórico de secuencias regulatorias en la región de control del gen de la PvACCasa

Mediante el programa de computadora PlantCARE (Lescot *et al.*, 2002; <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) se realizó un análisis teórico de las posibles secuencias regulatorias presente en el promotor de la PvACCasa (Figura 5.9) y encontramos diversas secuencias regulatorias de respuesta a fitohormonas como JA, etileno y auxinas, así como también secuencias regulatorias de respuesta a herida y patógenos. Dos secuencias regulatorias denominadas caja G (-1092 pb) y caja H (-1048 pb), las cuales se ha reportado son responsables de la expresión tejido-específico del promotor del gen *chs15* de frijol (Faktor *et al.*, 1997), fueron encontradas dentro de la secuencia del fragmento de 2716 pb del promotor de la PvACCasa, pero no dentro de los fragmentos menores. Ésto podría explicar el hecho de no observar actividad de GUS en las plantas transgénicas llevando construcciones menores a 786 pb de la región de control (Figura 5.9). Otra importante secuencia regulatoria encontrada fué la caja W1 (-288 pb), la cual une factores de transcripción WRKY (Eulgem *et al.*, 1999) y está implicada en la respuesta a herida, estrés oxidativo y patógenos.

Además de los elementos mencionados anteriormente, otros elementos involucrados en la respuesta a estrés fueron también encontrados, éstos incluyen los elementos de respuesta a etileno (ERE elements, -2609 y -2426 pb), los involucrados en la respuesta a auxinas (la caja TGA, -1292 pb) y los elementos de respuesta a MeJA (motivos CGTCA, -1289, -968 y -834 pb). Como se muestra en la figura 5.9 estas secuencias regulatorias están conservadas aunque no su posición dentro de los promotores del gen de la ACCasa de soya y *Arabidopsis*.

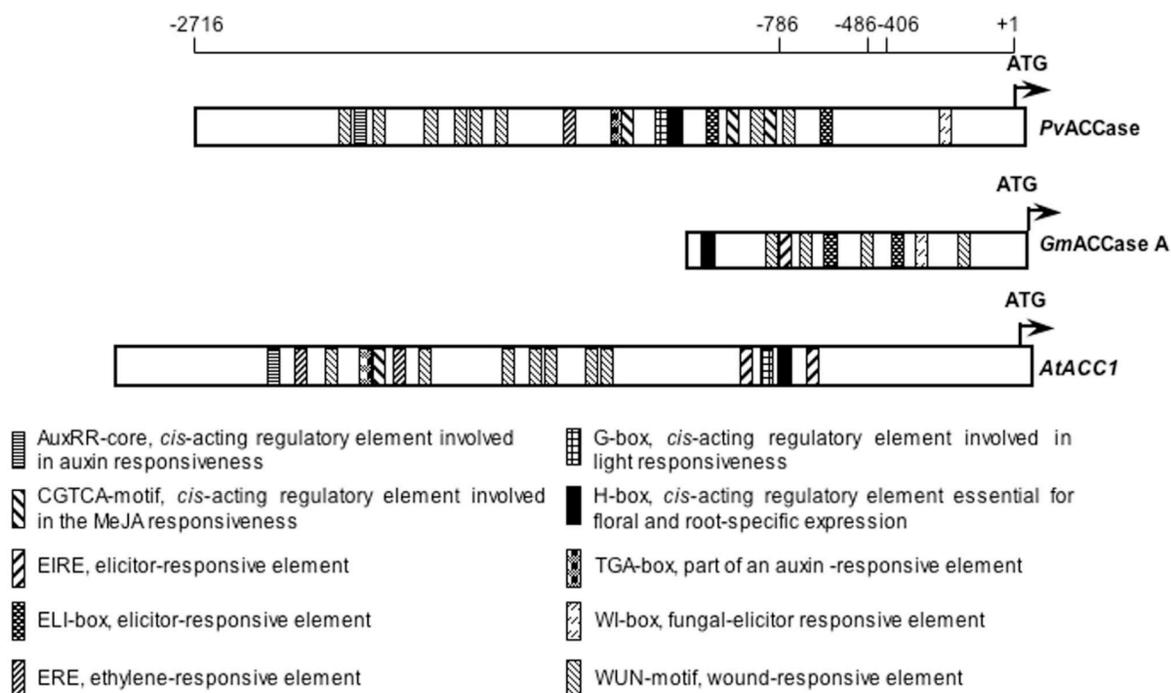


Figura 5.9. Comparación esquemática entre los promotores del gen de la ACCasa citosólica de frijol, soja y *Arabidopsis*. La figura muestra la localización de varios elementos en *cis* de interés identificados utilizando la base de datos del PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>). Los números en la parte superior indican los fragmentos del promotor del gen de la PvACCasa utilizados en los análisis de detección de la actividad de GUS. *Pv*, *Phaseolus vulgaris*; *Gm*, *Glycine max*; *At*, *Arabidopsis thaliana*.

5.4. Patrón tejido-específico de plantas transgénicas expresando PvACCasa::GUS

La actividad de GUS fué detectada en los hidátodos de las hojas de la roseta y caulina, estípulas, silicuas inmaduras, flores, estambres, estigma, polen y embriones (Figura 5.10). En la raíz principal, la actividad de GUS fué restringida a la punta de la raíz y a la zona de elongación (ZE) de plántulas de 5 días y en plántulas de 7 días la expresión sólo fué observada en la ZE, pero no en la zona meristemática (ZM). Por otra parte, en raíces laterales, la actividad de GUS fué observada fuertemente en los primordios de la raíz lateral y conforme fué desarrollándose, el patrón de expresión de GUS fué igual que en la raíz principal. Una fuerte actividad de GUS fué observada también en la zona de transición entre la raíz y el hipocotilo (ZT; Figura 5.11).

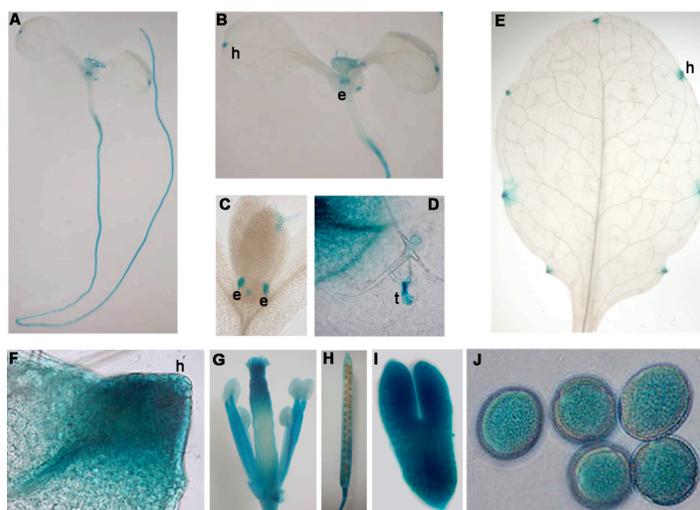


Figura 5.10. Patrón de expresión tejido-específico de plantas PvACCasa::GUS. A) plántula de 10 días; B) acercamiento de cotiledones mostrando la actividad de GUS en hidátodos (h) y estípulas (e); C) actividad de GUS en estípulas D) actividad de GUS en la base de los tricomas (t); E) actividad de GUS en los hidátodos de una hoja de la roseta; F) acercamiento de un hidátodo; G) actividad de GUS en estambres y estigma; H) silicua; I) embrión; J) polen.



Figura 5.11. Análisis histoquímico de la expresión del promotor del gen de la PvACCasa en raíces de *Arabidopsis*. A) raíz de 3 días; B) raíz de 5 días mostrando actividad de GUS en la punta y en la zona de elongación de la raíz; C) actividad de GUS en la zona de elongación de una raíz de 7 días; D) raíz de 5 días mostrando la actividad de GUS en la zona de transición entre la raíz y el hipocotilo (ZT); E) primordio de la raíz lateral (PRL) de una plántula de 7 días expresando GUS; F) Acercamiento de una raíz lateral (RL) emergiendo de una plántula de 7 días; G) raíces laterales de una plántula de 14 días.

Para confirmar los resultados de los ensayos de GUS y analizar la expresión de la ACCasa en frijol y *Arabidopsis*, se realizaron ensayos de hibridación *in situ* en plantas intactas. Como se puede observar en la figura 5.12, utilizando sondas en sentido y antisentido específicas de los genes de la ACCasa de *Arabidopsis* y frijol se detectó la presencia del transcrito en la raíz primaria así como en los primordios de las raíces laterales.

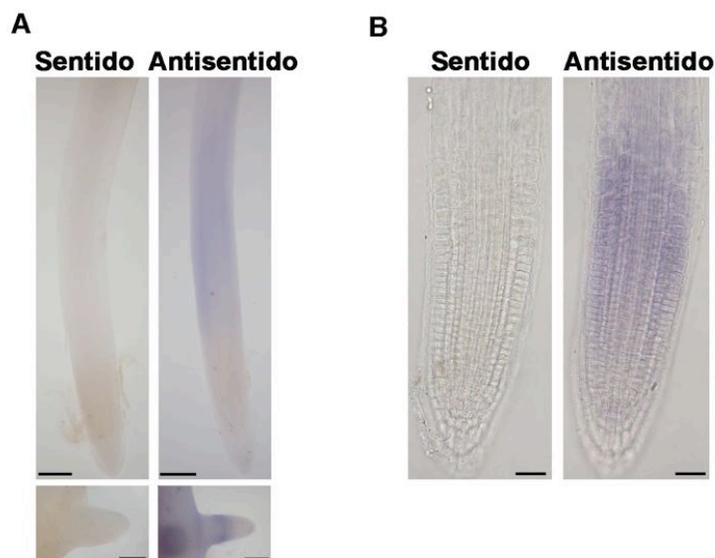


Figura 5.12. Hibridación *in situ* del mRNA de la ACCasa en raíces de plantas intactas de frijol y *Arabidopsis*. A) en la parte superior se muestra la hibridación *in situ* con sondas específicas del gen de la PvACCasa en sentido y antisentido sobre raíces de frijol de 3 días; en la parte inferior se muestra la hibridación *in situ* con las sondas descritas para la parte superior sobre las raíces laterales. B) Hibridación *in situ* con sondas específicas del gen de la AtACC1 en sentido y antisentido sobre raíces de *Arabidopsis* de 3 días. Escala: A, 250 μm ; B, 25 μm .

Por otra parte, raíces transgénicas de frijol portando el promotor del gen de la PvACCasa fusionado a GUS, confirmaron una vez más, la expresión observada en los ensayos de hibridación *in situ* y en los ensayos histoquímicos en *Arabidopsis* (Figura 5.13). Estas observaciones confirman que a pesar de ser una expresión heteróloga, el promotor de la PvACCasa se comporta igual en frijol que en *Arabidopsis*.

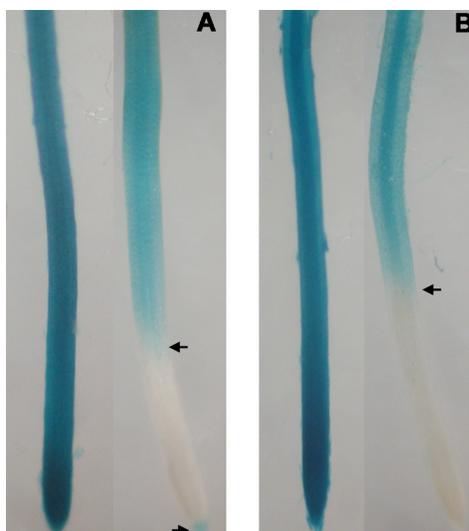


Figura 5.13. Actividad de GUS en raíces transgénicas de frijol. A) Raíz transgénica de frijol mostrando la expresión del gen quimérico PvACCasa::GUS en la punta y en la zona de elongación de la raíz; B) Raíz transgénica de frijol mostrando la expresión del gen quimérico PvACCasa::GUS únicamente en la zona de elongación. A la izquierda de ambas fotografías se muestran raíces transgénicas de frijol expresando la fusión 35SCaMV::GUS como control.

5.5. Efecto de la aplicación exógena de auxinas sobre la inducción del promotor en raíces.

Se ha reportado que la fitohormona auxina es determinante para la emergencia y desarrollo de la raíz lateral (Casimiro *et al.*, 2001). Varios estudios han demostrado también que algunos flavonoides colocalizan con regiones donde el transporte polar de auxinas es regulado (Murphy *et al.*, 2000; Peer *et al.*, 2001). Además, se han detectado altas concentraciones de auxinas libres en hidátodos, estípulas y puntas de la raíz (Aloni *et al.*, 2003). Debido a que observamos una fuerte expresión de la PvACCasa en regiones donde la auxina ha sido detectada, evaluamos la inducción del promotor en raíces en respuesta a auxinas. A 48 h se detectó una fuerte tinción en los primordios de raíces laterales en presencia de auxinas, como es de esperarse, ya que hay que recordar que el promotor de la PvACCasa se expresa en los primordios de la raíz lateral (Figura 5.14). A 120 h, observamos el mismo patrón de expresión en raíces tanto en presencia como en ausencia de auxinas. En la parte aérea sin embargo, esta fitohormona fué capaz de inducir la expresión del promotor después de 6 h del tratamiento (Figura 5.18).

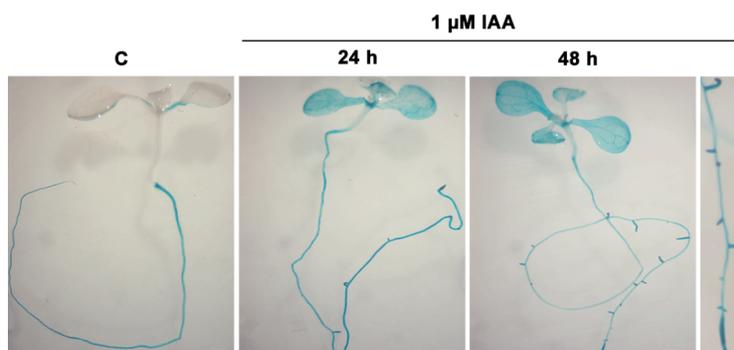


Figura 5.14. Efecto de la aplicación de auxinas sobre la expresión del promotor del gen de la PvACCasa en raíces. Actividad de GUS en plántulas de 8 días sin tratar (C) o tratadas con $1 \mu\text{M}$ de IAA por los tiempos indicados en la parte superior de cada imagen. Escala= 1 mm.

5.6. El promotor del gen de la PvACCasa es inducido por estrés biótico y abiótico

La herida mecánica es uno de los factores que induce la síntesis de fitoalexinas. Una fuerte actividad de GUS fué localizada sólomente alrededor de la zona herida y no así en las células que están muertas debido al efecto de la herida (Figura 5.15).

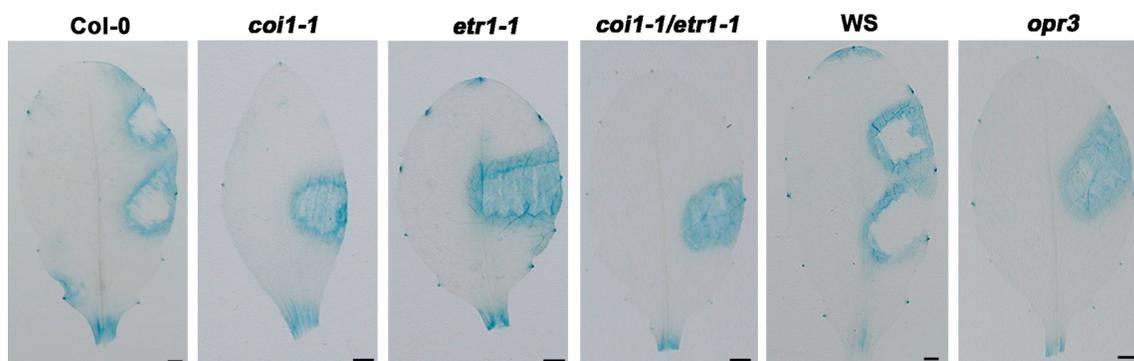


Figura 5.15. Efecto de la herida sobre la expresión del promotor del gen de la PvACCasa. Actividad de GUS en hojas de la roseta de 5-6 semanas de plantas Col-0, *coi1-1*, *etr1-1*, *coi1-1/etr1-1*, WS y *opr3* que expresan el gen quimérico PvACCasa::GUS 6 h después de la herida mecánica. Escala= 1 mm

La inducción de la expresión del gen de la ACCasa tanto en frijol como en *Arabidopsis* fué analizada por RT-PCR, con la finalidad de evaluar su inducción en respuesta a herida. Como se observa en la figura 5.16, la inducción del transcrito en respuesta a herida es igual en ambas especies, sugiriendo un mecanismo de respuesta conservado.

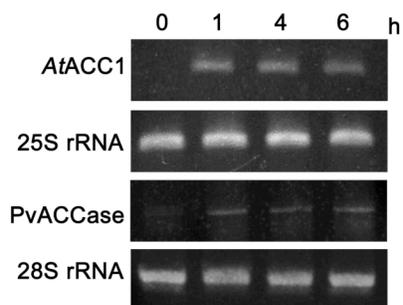


Figura 5.16. Inducción del mRNA del gen de la ACCasa en frijol y *Arabidopsis* en respuesta a herida. Análisis mediante RT-PCR de la acumulación del transcrito de la ACCasa en plantas de frijol y *Arabidopsis* después de la herida por los tiempos indicados. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para la detección del mensajero del gen de la *AtACC1* y *PvACCCase*.

El ataque por patógenos o la aplicación de elicitors de hongos son capaces de inducir la producción de fitoalexinas debido a la inducción de los transcritos de las enzimas involucradas en esta síntesis (Bell *et al.*, 1984; Ryder *et al.*, 1984; Lawton *et al.*, 1987). En frijol, García-Ponce y Rocha-Sosa (2000) determinaron que el transcrito de la ACCasa se induce por el patógeno biotrófico *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* y por un elicitor de levadura. Para evaluar la inducción del promotor en respuesta a patógenos, asperjamos plantas *PvACCCase::GUS* con una suspensión de 1×10^8 ufc del patógeno *Pseudomonas syringae* pv *tomato/AvrRpm1* el cual muestra una interacción incompatible con *Arabidopsis*. Después de 6 h del tratamiento, encontramos una fuerte actividad de GUS en hojas que fueron tratadas con este patógeno aunque también detectamos una expresión menor de GUS en nuestro control, ésto creemos debido al daño producido por el tratamiento (Figura 5.17).

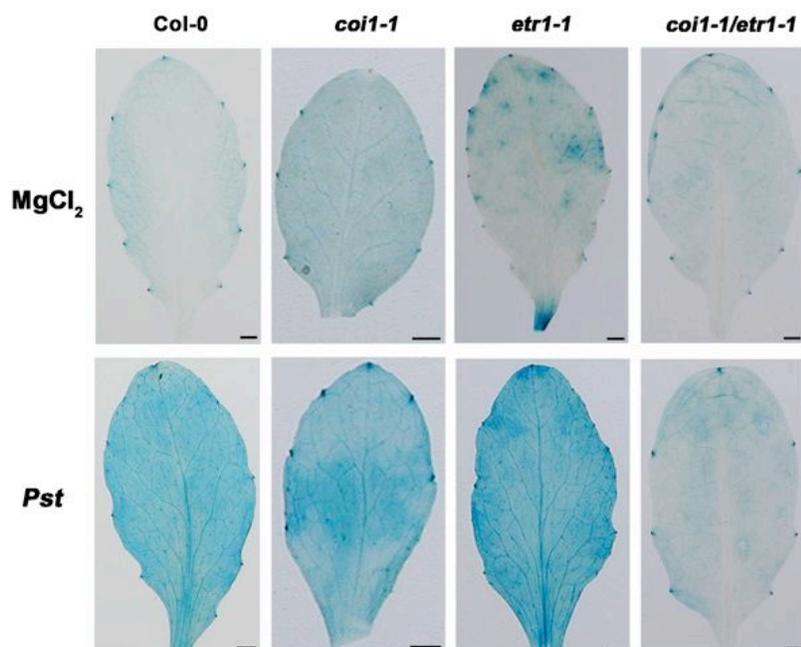


Figura 5.17. Efecto de la infección por patógenos sobre la expresión del promotor del gen de la PvACCasa. Actividad de GUS en hojas de la roseta de 5-6 semanas de plantas Col-0, *coi1-1*, *etr1-1*, *coi1-1/etr1-1*, que expresan el gen quimérico PvACCasa::GUS 6 h después de la infección con *P. syringae* pv *tomato* (*Pst*). MgCl₂ fué utilizado como control. Escala= 1 mm

En frijol, se encontró que el transcrito de la ACCasa es inducido por MeJA (García-Ponce y Rocha-Sosa, 2000). Para evaluar si en *Arabidopsis* la PvACCasa es inducida por MeJA, plantas PvACCasa::GUS de 8 días fueron tratadas con 100 μ M de MeJA durante un período de 6 h. El tratamiento con MeJA fué capaz de inducir la actividad de GUS (Figura 5.18). Otra fitohormona implicada en la respuesta de defensa es el etileno y en frijol se encontró que el transcrito de la ACCasa era inducido con esta fitohormona (García-Ponce, 2000). Plantas PvACCasa::GUS se trataron durante 6 h con 200 μ M de ácido carboxílico aminociclopropano (ACC), el cual es el precursor del etileno. Encontramos que efectivamente, el etileno es capaz de inducir fuertemente la actividad de GUS (Figura 5.18).

Como parte de su programa de defensa, las plantas inducen la síntesis de ERO, las cuales a su vez inducen la síntesis de metabolitos secundarios. Con el propósito de evaluar la participación de la PvACCasa en respuesta al estrés oxidativo, plantas PvACCasa::GUS de 8 días fueron tratadas con H₂O₂. Como muestra la figura 5.18 existe, una fuerte expresión de GUS 6 h después del tratamiento con H₂O₂.

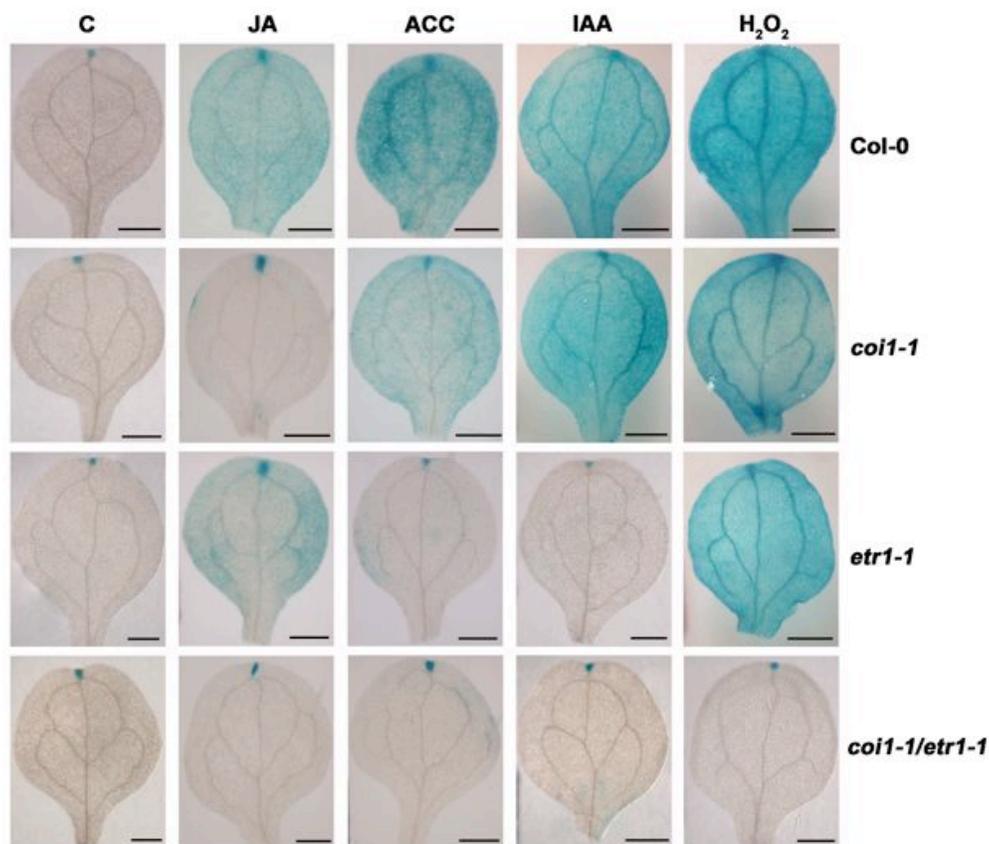


Figura 5.18. Efecto de la aplicación de hormonas y estrés oxidativo sobre la expresión del promotor del gen de la PvACCasa. Actividad de GUS en plántulas de 8 días de Col-0, *coi1-1*, *etr1-1* y *coi1-1/etr1-1* que expresan el gen quimérico PvACCasa::GUS. C, control ó 6 h después del tratamiento con 100 µM de MeJA, 200 µM ACC, 1 µM IAA, 1 mM H₂O₂. Escala= 0.5 mm.

Por otra parte, la acumulación del transcrito de la PvACCasa en respuesta al estrés oxidativo en frijol fué analizado mediante RT-PCR y como se puede observar en la figura 5.19 el mRNA de la PvACCasa se acumula 24 h después del tratamiento con H₂O₂.

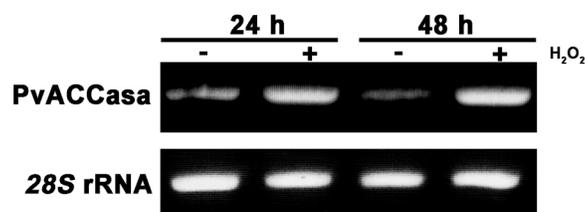


Figura 5.19. Efecto del H_2O_2 sobre la expresión del mRNA del gen de la PvACCasa. Análisis mediante RT-PCR de la expresión del transcrito del gen de la PvACCasa en los tiempos indicados en la parte superior de la figura después de la infiltración de 1 mM de H_2O_2 (+) ó agua como control (-).

5.7. Las vías de señalización de JA y etileno actúan de manera independiente en la inducción de la ACCasa en el desarrollo y defensa.

Con la finalidad de determinar la jerarquía de JA y etileno en la señalización para la inducción del gen de la PvACCasa bajo diferentes condiciones de estrés y desarrollo, generamos cruza con la planta PvACCasa::GUS y con plantas mutantes en la percepción (*coi1-1*) y síntesis de JA (*opr3*), así como también con la mutante en la percepción del etileno (*etr1-1*). El análisis histoquímico en cada una de estas cruza, reveló el mismo patrón de expresión tejido-específico que observamos en el fondo silvestre (Figura 5.20). Se detectó actividad de GUS en hidátodos, silicuas inmaduras, flores, estambres, estigma, polen y embriones. Al igual que en el fondo silvestre, también el mismo patrón de expresión en la raíz fué observado en todas las cruza con las mutantes, sugiriendo que estas vías participan de manera independiente en la inducción de la PvACCasa durante el desarrollo, o bien, que durante el desarrollo otro(s) factor(es) modulan la activación del gen de la PvACCasa.

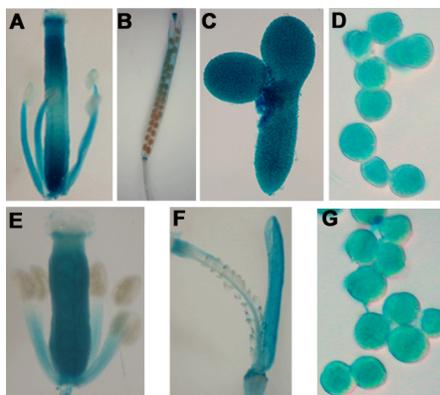


Figura 5.20. Patrón de expresión tejido-específico en mutantes de *Arabidopsis*. Cruzas con la línea transgénica expresando el gen quimérico PvACCasa::GUS. A-D) en el fondo *etr1-1*; E-F) en el fondo *coi1-1*. A y E, Flor; B y F, silicua; C) embrión; D y G, polen.

Por otra parte, para analizar la participación del JA y etileno en la inducción de la PvACCasa en respuesta a estrés, sometimos hojas de la roseta de cada una de las cruzas a los mismos estímulos que a la planta transgénica en el fondo silvestre. Debido a su fenotipo de macho estéril y a la carencia de semillas para analizar más detalladamente la cruce con la mutante *opr3*, solamente la respuesta a herida fué analizada en esta cruce. La herida y la infección con *Pst* fueron capaces de inducir la actividad de GUS en las cruces analizadas (Figura 5.15 y 5.17). El MeJA y el ACC también fueron capaces de inducir la actividad de GUS en las mutantes *etr1-1* y *coi1-1* respectivamente. Auxina fué capaz de inducir la actividad de GUS en la mutante *coi1-1*, por el contrario, en la mutante *etr1-1* no se detectó inducción (Figura 5.18). Estos resultados nos sugieren que las auxinas, podrían estar induciendo a la PvACCasa de manera indirecta debido a su capacidad para inducir la síntesis de etileno. Por otra parte, el estrés oxidativo provocado por el H₂O₂ fué capaz de inducir el promotor independientemente del fondo mutante (*coi1-1* o *etr1-1*). Todos estos resultados sugieren que JA y etileno, actúan independientemente para inducir a la PvACCasa durante el desarrollo y estrés (Figura 5.18).

Para evaluar en más detalle la participación de las vías de señalización del JA y etileno, generamos una doble mutante *coi1-1/etr1-1*. Al tratar esta doble mutante con JA y etileno no detectamos inducción -como es de esperarse-, pero al someter estas plantas a herida, observamos la tinción alrededor de la zona herida (Figura 5.15). Este resultado sugiere,

que al menos para herida, además de la vía de JA y etileno, podría estar participando otra vía de señalización para la inducción del gen de la PvACCasa. Si en todo caso, las auxinas están induciendo a la PvACCasa a través del etileno, en esta doble mutante no se esperaría inducción del promotor, y como se observa en la figura 5.18, esta expresión en respuesta a auxina es abatida en la doble mutante. Este resultado confirma la hipótesis de que el gen de la PvACCasa se induce a través del etileno y no por auxinas. En respuesta a patógenos y estrés oxidativo, por el contrario se requiere de al menos una de las vías de señalización (JA o etileno) activa para la inducción de la PvACCasa, ya que en la doble mutante tanto *Pst* como H₂O₂ fueron incapaces de inducir el promotor (Figura 5.18).

5.8. Análisis de la expresión de genes de respuesta a estrés

Como controles de tratamiento, analizamos la expresión de genes que responden a diferentes condiciones de estrés utilizando la técnica de RT-PCR. Los genes analizados fueron: *Pdf1.2* (At5g44420), gen de una defensina vegetal que responde a JA y etileno; *Hell* (At3g04720), gen Hevein-like, el cual codifica una proteína relacionada a patogénesis (*PR*) y responde a etileno, patógenos y estrés oxidativo; *IAA19* (At3g15540), auxin-responsive protein/indoleacetic acid-induced protein 19, gen marcador de respuesta a auxinas; *GST6* (At2g47730), gen de la Glutathion S-transferasa 6, marcador de la respuesta a estrés oxidativo. Como muestra la figura 5.21, la expresión de estos genes marcadores fué inducida en respuesta a cada uno de los tratamientos utilizados, lo que valida los resultados obtenidos en los análisis de expresión del promotor del gen de la PvACCasa bajo estas condiciones de estrés.

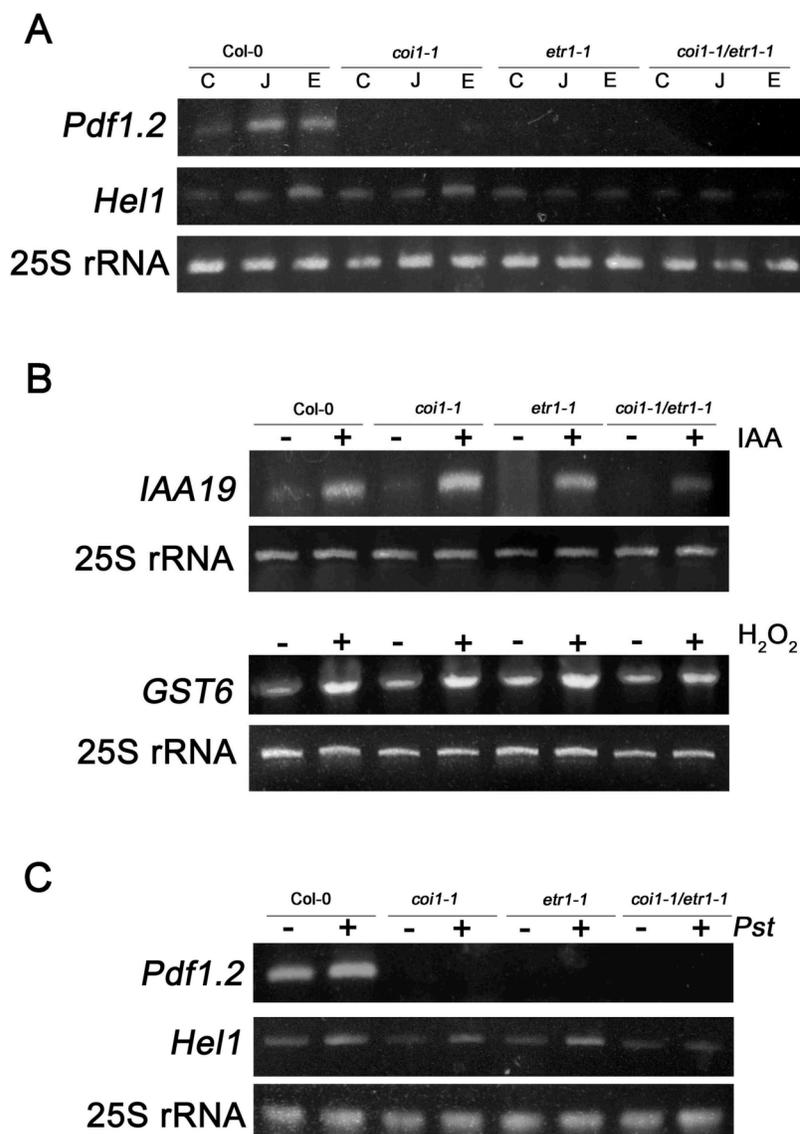


Figura 5.21. Análisis por RT-PCR de la expresión de genes de respuesta a estrés. El RNA utilizado para los análisis de RT-PCR fué extraído de plántulas de 8 días de Col-0, *coi1-1*, *etr1-1* and *coi1-1/etr1-1* que expresan el gen quimérico PvACCCase::GUS. **A)** control (C), o 6 h después del tratamiento con 100 μ M MeJA (J) ó 200 μ M ACC (E). **B)** 6 h después del tratamiento con (+) o sin (-) 1 μ M IAA o 1 mM H_2O_2 . **C)** 6 h después de la asperción con 10 mM $MgCl_2$ como control (-) y 6 h después de la asperción con (+) *P. syringae* pv *tomato* (*Pst*). El rRNA 25S fué utilizado como control interno de carga.

5.9. El calcio participa en la inducción del promotor del gen de la PvACCasa

Se ha demostrado que la herida es capaz de inducir genes que codifican proteínas que unen Ca^{2+} y algunos de éstos responden también al ataque de patógenos (Heo *et al.*, 1999). Además, se ha reportado que tanto vías de señalización dependientes e independientes del JA son reguladas por la movilización del calcio intracelular y por actividades como calmodulina (León *et al.*, 1998). Debido a que el promotor de la PvACCasa es inducido en respuesta a la herida independientemente de la percepción de JA y etileno (figura 5.15), decidimos analizar la participación del calcio en la inducción del promotor del gen de la PvACCasa.

Plántulas de las diferentes líneas analizadas (transgénica silvestre y mutantes), fueron cultivadas en medio de germinación sin aporte de calcio. Como se muestra en la tabla 1, al tratar con EGTA (quelante de calcio) en conjunto con los inductores JA ó etileno, ninguna de las líneas analizadas mostraron actividad de GUS. Estos datos sugieren la participación del calcio en las vías de señalización de JA y etileno para la inducción de la PvACCasa.

Tabla 1. Participación del calcio en la inducción del promotor del gen de la PvACCasa				
Tratamientos	Col-0	<i>coil-1</i>	<i>etr1-1</i>	<i>coil-1/etr1-1</i>
ST	-	-	-	-
EGTA	-	-	-	-
MeJA	+	-	+	-
ACC	+	+	-	-
MeJA+EGTA	-	-	-	-
ACC+EGTA	-	-	-	-

Tabla 5.1. Efecto de la ausencia de calcio sobre la expresión del promotor del gen de la PvACCasa. Plántulas de 8 días de Col-0, *coil-1*, *etr1-1* and *coil-1/etr1-1* que expresan el gen quimérico PvACCasa::GUS fueron cultivadas en medio de germinación sin aporte de calcio y tratadas 6 h con 10 mM EGTA, 100 μM MeJA, 200 μM ACC o la combinación de éstos como se señala en la tabla. Plántulas cultivadas únicamente en el medio de germinación sin aporte de calcio fueron utilizadas como control. Los símbolos + y - indican la presencia o ausencia respectivamente de la actividad de GUS.

5.10. La inducción del promotor del gen de la PvACCasa en el hipocotilo en la oscuridad requiere de JA y etileno

La luz juega un papel importante en una variedad de procesos en el desarrollo de las plantas, como el desarrollo del cloroplasto, la elongación del hipocotilo, la expansión foliar y la floración. La exposición a la luz afecta tanto el metabolismo primario como el secundario. La biosíntesis de algunos metabolitos como flavonoides se lleva a cabo a través de la vía de los fenilpropanoides. La inducción de la biosíntesis de flavonoides por luz ha sido bien caracterizada principalmente a través del análisis de la acumulación de antocianinas (Jenkins *et al.*, 2001). Experimentos recientes demostraron que raíces de *Arabidopsis* crecidas en la oscuridad no son capaces de acumular flavonoides (Buer y Muday, 2004), por lo que para nosotros resultó interesante analizar la expresión de la PvACCasa::GUS en estas condiciones. Todas las líneas analizadas mostraron actividad de GUS en raíces. Aunque resulta contradictorio detectar actividad de GUS en raíces, este resultado puede ser explicado por el hecho de que niveles similares de expresión de genes de la vía de los fenilpropanoides se han observado tanto en raíces crecidas en luz como en oscuridad (Hemm *et al.*, 2004). La ausencia de flavonoides en raíces de plantas etioladas posiblemente podría deberse a modificaciones postranscripcionales de genes de la vía de de los fenilpropanoides. Interesantemente, en la parte superior del hipocotilo no observamos actividad de GUS en la doble mutante cuando es comparada con las otras líneas, sugiriendo la participación de cualquiera de las vías de señalización (JA y etileno) en la expresión de la PvACCasa::GUS en esta zona (Figura 5.22).

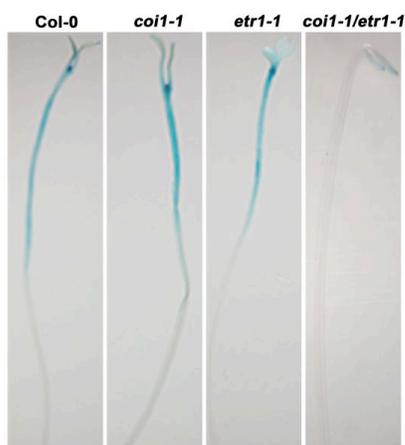


Figura 5.22. Efecto de las mutaciones *coi1-1* y *etr1-1* sobre la actividad de GUS en la oscuridad. Plántulas Col-0, *coi1-1*, *etr1-1* and *coi1-1/etr1-1* que expresan el gen quimérico PvACCasa::GUS fueron cultivadas durante 8 días en la oscuridad y teñidas para su análisis histoquímico.

6. Discusión

No obstante los diversos estudios reportados en la literatura en relación al papel de la ACCasa citosólica en la biosíntesis de flavonoides, existe poca información concerniente a los factores endógenos que regulan su expresión o su distribución órgano y tejido específico en frijol o *Arabidopsis*. Debido a lo anterior, uno de los objetivos centrales planteados en el presente estudio fué conocer que factores genéticos son necesarios en la regulación del gen de la PvACCasa en respuesta a estrés. Para tratar de clarificar esta regulación, nosotros utilizamos plantas transgénicas de *Arabidopsis* silvestres y mutantes en las vías de señalización de JA y etileno, evitando de esta manera el uso de inhibidores.

Los resultados del análisis de la región reguladora, revelaron la existencia de diversos elementos en *cis* que previamente se les había demostrado que controlan respuestas a herida, patógenos y hormonas. La comparación de la región promotora del gen de la PvACCasa con su homólogo en soya y *Arabidopsis* indicaron que estas secuencias están altamente conservadas. Se ha reportado que promotores de la vía de los fenilpropanoides contienen elementos conocidos como la caja-G y la caja-H separados por 38 pb, los cuales son necesarios para la expresión específica en raíz y flor (Faktor *et al.*, 1997). Es interesante que estos mismos elementos fueron encontrados en la región promotora del gen de la PvACCasa y que en construcciones que carecen de estos elementos no ocurre la inducción del promotor. Se ha descrito que el factor de transcripción *G/HBF-1* se une a las cajas G y H presentes en el promotor del gen de la *chs15* de frijol. La proteína *G/HBF-1* es fosforilada en células de soya “elicitadas” y ensayos *in vitro* demostraron que esta fosforilación aumenta su unión al promotor del gen de la *chs15* sugiriendo su participación en la vía de señalización para la activación de respuestas de defensa en plantas (Droge-Laser *et al.*, 1997).

Otra secuencia regulatoria encontrada en el promotor del gen de la PvACCasa fué la caja-W. Se ha demostrado que los factores de transcripción WRKY se unen a estas secuencias (Eulgem *et al.*, 1999). Los factores de transcripción WRKY juegan un papel clave en la regulación del programa de defensa inducida por patógenos (Yang *et al.*, 1999), además

también parecen estar participando en otros procesos específicos de la planta, tales como el desarrollo de los tricomas y la biosíntesis de metabolitos secundarios (Walker *et al.*, 1999). Por otra parte, se ha demostrado también que la caja-W está involucrada en la respuesta a herida ya que los factores de transcripción WRKY se acumulan rápida y sistémicamente después de este estímulo (Hara *et al.*, 2000).

En este trabajo, se analizó detalladamente el patrón de expresión tejido-específico del promotor del gen de la PvACCasa durante el desarrollo. Plantas transgénicas que expresan al gen quimérico PvACCasa::GUS presentaron una fuerte expresión de GUS en los tejidos en crecimiento como silicuas inmaduras, estigma, estambres y polen. Se ha reportado que en tejidos que crecen y maduran activamente, se acumulan compuestos flavonoides (Peer *et al.*, 2001). Interesantemente, en los hidátodos y estípulas de las hojas de la roseta encontramos una fuerte expresión de GUS. Los hidátodos son glándulas conectadas al sistema vascular de la hoja los cuales secretan sales, azúcares y compuestos orgánicos disueltos en agua en el proceso conocido como gutación (Goatley y Lewis, 1966). Se ha encontrado que los hidátodos son los sitios de entrada y de infección primaria de la bacteria patógena necrotrófica *Xanthomonas campestris* pv *campestris* en *Arabidopsis* (Hugouvieux *et al.*, 1998). Además, se ha encontrado que el transcrito de la enzima ChS la cual es la enzima clave en la síntesis de flavonoides y que utiliza al malonil-CoA citosólico sintetizado por la ACCasa está inducida principalmente en los hidátodos de las hojas (Aloni *et al.*, 2003). Ésto correlaciona con la expresión de la ACCasa que se encuentra en los hidátodos, ya que el malonil-CoA sintetizado por la ACCasa puede dar lugar a la formación de compuestos flavonoides, los cuales pueden ser utilizados ya sea como una barrera primaria en la defensa contra patógenos o como reguladores del transporte de auxinas.

Durante el desarrollo del primordio de la hoja, hay cambios graduales en la localización de la producción de auxinas libres y en la concentración de estimulación de auxinas (Aloni *et al.*, 2003). Se ha demostrado que los hidátodos y las estípulas son los sitios primarios de producción de auxinas libres, mientras que los tricomas y las células del mesófilo son los sitios secundarios. Se ha sugerido además, que la producción de auxina

libre en los hidátodos es requerida para la formación del tejido vascular y que los compuestos flavonoides actúan retardando el transporte de auxina libre en éstos y consecuentemente el desarrollo de los márgenes y la lámina en las regiones de la hoja hacia la punta, lo cual causa el patrón basipetalo típico de la maduración del tejido durante la morfogénesis de la hoja, (Aloni *et al.*, 2003).

Otro dato interesante que encontramos fué que la expresión de GUS en la raíz estuvo restringida a la ZT, ZE y en la punta de la raíz, pero no en la ZM. Ésto también correlaciona con la síntesis de flavonoides (principalmente quercetina, naringenina y camferol) y con la acumulación de auxinas en las mismas zonas en *Arabidopsis* (Sabatini *et al.*, 1999) además, se ha demostrado que estos flavonoides actúan como reguladores negativos del transporte polar de auxinas (Peer *et al.*, 2001). Utilizando la técnica de hibridación *in situ* en raíces de *Arabidopsis* y frijol, el transcrito de la ACCasa se detectó en la punta de la raíz y en la ZE en frijol. En plántulas de *Arabidopsis* de 3 días se detectó una fuerte señal del transcrito del gen *AtACCI* en la ZM de la raíz y una señal más ligera en la punta y en la ZE de la raíz. Estos resultados coinciden con los encontrados en el ensayo histoquímico y con los obtenidos en las raíces transgénicas de frijol y sugieren que la regulación del gen de la ACCasa citosólica podría estar conservada entre ambas especies. Adicionalmente, enzimas de la vía de síntesis de los flavonoides como la ChS y la chalcona isomerasa están localizadas en el mismo tejido donde el promotor del gen de la PvACCasa es activo y los transcritos de los genes PvACCasa y *AtACCI* están presentes (Saslowsky y Winkel-Shirley, 2001).

Con la finalidad de analizar la posibilidad de que las auxinas estén regulando la expresión del gen de la PvACCasa, se trataron plantas que expresan el gen quimérico PvACCasa::GUS con auxina. Esto resultó en la inducción del promotor en la parte aérea. Sin embargo, en el fondo mutante *etr1-1* esta inducción no fué observada, lo que sugiere que las auxinas activan al promotor del gen de la PvACCasa indirectamente a través de su capacidad de inducir la síntesis de etileno (McKeon *et al.*, 1995). Por los resultados obtenidos en la raíz y en la parte aérea en respuesta a auxinas, posiblemente la inducción

del promotor del gen de la PvACCasa responde a una señal de desarrollo y no directamente a auxinas.

La ACCasa tiene un papel importante durante el desarrollo de la planta, particularmente en la embriogénesis. Se ha encontrado que mutantes en el gen *ACC1*, el cual codifica la ACCasa citosólica de *Arabidopsis* están afectadas en el desarrollo del embrión y al suministrar malonato exógenamente puede ser restablecido su desarrollo (Baud *et al.*, 2004). Debido a que todas las mutantes en la síntesis de flavonoides reportadas tienen embriones normales, lo más probable es que la ausencia de los VLCFA y sus derivados podrían ser la causa de la detención del desarrollo del embrión en las mutantes *acc1* (Baud *et al.*, 2003). Con respecto a esto, nosotros encontramos una fuerte expresión de PvACCasa::GUS en los embriones de *Arabidopsis* sugiriendo un papel importante de la ACCasa en la embriogénesis de frijol.

Diversos estudios previos han demostrado que los flavonoides se acumulan en anteras y pistilos, y que están involucrados en el desarrollo y germinación del polen (Mo *et al.*, 1992; Weiss 1991). Una mutante de petunia que carece de flavonoides es macho estéril debido a que el polen no germina. La adición exógena del flavonoide camferol restablece la expresión de genes específicos del polen, lo cual resulta en la germinación y el crecimiento del tubo polínico (Van der Meer *et al.*, 1992; Guyon *et al.*, 2000). Sin embargo, en *Arabidopsis* la carencia de flavonoides en flores y estambres no afecta la fertilidad, lo que sugiere que los flavonoides no son universalmente requeridos para la fertilidad (Burbulis *et al.*, 1996). Una expresión fuerte de GUS fué observada en el polen de las plantas transgénicas expresando el gen quimérico PvACCasa::GUS. En la base de datos de expresión de genes GENEVESTIGATOR (Zimmermann *et al.*, 2004) el mRNA del gen de la ACCasa citosólica de *Arabidopsis* (*ACC1*, At1g36160) se expresa a niveles muy bajos en el polen. Por otra parte, se ha sugerido que GUS es liberado de residuos del tapetum y entonces es absorbido por los granos de polen (Preston *et al.*, 2004). De acuerdo a lo anterior, si el promotor del gen de la PvACCasa presenta el mismo patrón de expresión que el promotor del gen *ACC1*, posiblemente la fusión PvACCasa::GUS se esté expresando en el tapetum y no en el polen.

Previamente, se ha reportado que el transcrito del gen de la ACCasa citosólica de frijol es inducida en respuesta a herida, patógenos, elicitores, JA y etileno (García-Ponce y Rocha-Sosa, 2000, García-Ponce, 2000). La participación del gen de la PvACCasa en la respuesta al estrés, se verificó cuando se analizó su promotor en *Arabidopsis*. Nosotros encontramos que el promotor del gen de la PvACCasa responde al tratamiento con JA, etileno, herida, patógenos y estrés oxidativo en *Arabidopsis* sugiriendo su participación en la defensa sin importar que éste sea un sistema de expresión heterólogo. Para determinar el número y la jerarquía de las vías de transducción de señales, analizamos la expresión de GUS en mutantes afectadas en la síntesis y percepción de JA (*coil-1*, *opr3*) y en la percepción de etileno (*etr1-1*).

Cuando las plantas en los diferentes fondos genéticos analizados *opr3*, *coil-1* y *etr1-1* así como en la doble mutante *coil-1/etr1-1* fueron heridas, éstas exhibieron expresión de GUS, por lo tanto la participación de otra vía de señalización además del JA y etileno es requerida para esta respuesta. Los datos preliminares obtenidos en el presente trabajo con la mutante *opr3*, en la cual únicamente la síntesis de JA está afectada pero no así la síntesis de OPDA, sugieren que posiblemente el OPDA esté implicado en la respuesta a herida. Esta idea es consistente con los resultados reportados por Taki *et al.* (2005), los cuales demuestran que el OPDA es capaz de inducir varios genes en respuesta a herida en una vía independiente de la señalización de COI1. Por otra parte, también hay evidencias de que los oligogalacturonidos de la pared celular liberados por la herida pueden funcionar como elicitores provocando la síntesis de fitoalexinas y que además, el SA podría ser mediador en esta respuesta (Rocher *et al.*, 2005).

El calcio (Ca^{2+}) es un regulador esencial de respuestas a varios estímulos que actúan mediante diversas vías de señalización (Bush, 1995). La concentración de Ca^{2+} aumenta en el citosol como resultado de la captura, a través de los canales de la membrana plasmática o de la liberación de almacenes internos, como el retículo endoplasmático y la vacuola (Gilroy *et al.*, 1990). Existen evidencias implicando la participación del calcio en la transducción de señales dependientes e independientes del JA en respuesta a herida

(León *et al.*, 1998) y en la transducción de señales del etileno (Raz y Fluhr, 1992). Cuando tratamos las plantas transgénicas y mutantes (*coi1-1*; *etr1-1*; *coi1-1/etr1-1*) expresando el gen quimérico PvACCasa::GUS con el quelador de Ca^{2+} , EGTA, se observó inhibición de la expresión de GUS mostrada en respuesta al tratamiento con JA y etileno. Estos resultados indican que bajo las condiciones experimentales utilizadas, el Ca^{2+} juega un papel clave en las vías de señalización de JA y etileno para la inducción del gen de la PvACCasa.

Los resultados presentados en este trabajo sugieren que la activación de la PvACCasa por el estrés oxidativo provocado por patógenos ocurre a través de vías de señalización dependientes de JA o etileno, necesitando de al menos una de estas vías intactas. Además, de acuerdo a los resultados obtenidos en *Arabidopsis* estas vías están conservadas en frijol. De acuerdo con los datos obtenidos en las cruces con las mutantes creemos, que tanto el JA como el etileno podrían estar participando de manera independiente en la inducción del gen de la ACCasa durante el desarrollo y defensa de la planta, ésto no es raro ya que se han descrito interacciones entre estas fitohormonas, por ejemplo, para el gen *ERF1* estas vías actúan independientemente una de la otra para inducirlo y de esta manera desencadenan respuestas de defensa (Lorenzo *et al.*, 1993).

Finalmente, este trabajo proporciona información relevante en relación a la regulación del gen de la ACCasa citosólica de frijol. Los resultados del presente estudio demuestran que el promotor del gen de la PvACCasa es inducido en respuesta a las diferentes condiciones de estrés analizadas, destacando su participación en la respuesta de defensa al igual que otras enzimas de la vía de los fenilpropanoides. Nosotros proponemos un modelo (Figura 8.1) de participación de las vías de señalización de JA y etileno para la inducción del gen de la PvACCasa en respuesta al estrés provocado por la herida mecánica o la infección por patógenos

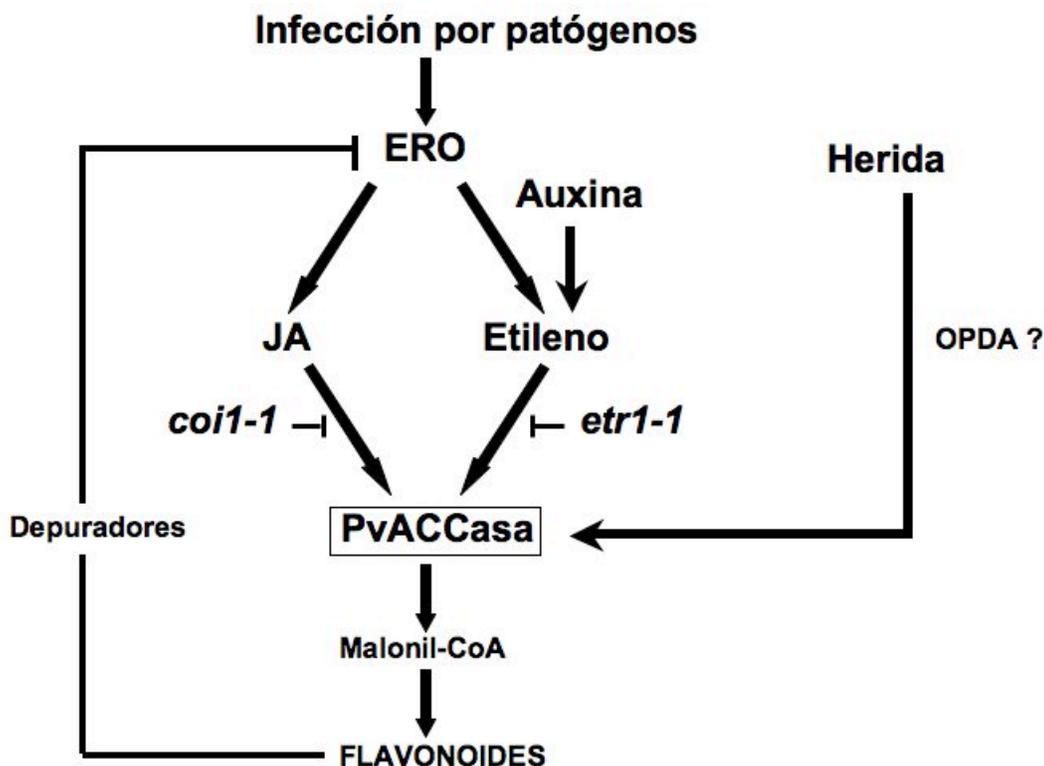


Figura 8.1. Modelo propuesto de activación del promotor del gen de la PvACCasa. La activación del promotor del gen de la PvACCasa inducida por patógenos y ERO puede utilizar cualquiera de las dos vías de señalización: la de respuesta a JA (COI1) y la de respuesta a etileno (ETR1). En este esquema, nosotros colocamos a las ERO hacia abajo de la infección por patógenos, esto con base en que se conoce que las ERO son generadas durante la respuesta hipersensible causada por una interacción incompatible planta-patógeno (Dat *et al.*, 2000). Los flavonoides producidos en respuesta a la infección actúan como cosechadores de ERO, limitando de esta manera el daño causado por este estrés. Las auxinas activaron el promotor del gen de la PvACCasa indirectamente a través de la capacidad de las auxinas para promover la síntesis de etileno. La herida induce la activación del gen de la PvACCasa por una vía de señalización independiente de ambos JA y etileno.

7. Conclusiones

1. La región entre -786 y -2800 pb en la región de control del gen de la ACCasa de frijol se requiere para la expresión específica de tejido y en respuesta a estrés en plantas transgénicas de Arabidopsis.
2. La expresión del gen de la PvACCasa es regulada por JA, etileno, H₂O₂, herida y patógenos.
3. Se encontró que la expresión del gen de la PvACCasa en hidátodos y en raíz (ZE, ZT, raíz lateral y primordios) coincide con los sitios de la acumulación de flavonoides así como con los sitios de respuesta a auxinas.
4. El análisis de hibridación *in situ* y en las raíces transgénicas de frijol revelaron el mismo patrón de expresión que las plantas transgénicas de Arabidopsis expresando el promotor del gen de la PvACCasa
5. De acuerdo a los datos con las mutantes, las vías de señalización de JA y etileno para la inducción de la ACCasa se activan de manera independiente.
6. La participación de otra vía de señalización además del JA y etileno está implicada en la inducción de la PvACCasa en respuesta a herida.
7. La fitohormona auxina induce el promotor de la PvACCasa indirectamente, en manera dependiente de etileno.
8. La inducción de la expresión del gen de la PvACCasa por estrés oxidativo y patógenos requiere de alguna de las dos vías de señalización (JA o etileno) intacta.

8. Perspectivas

- Con la finalidad de tener un análisis más detallado se propone utilizar diferentes deleciones del promotor para evaluar secuencias regulatorias de interés.
- Analizar comparativamente la expresión del gen de la PvACCasa en mutantes afectadas en la síntesis de JA y OPDA (*aos*) y en mutantes afectadas en la síntesis de JA pero no en la síntesis de OPDA (*opr3*).
- Analizar la regulación del gen de la PvACCasa en cruces de la línea transgénica PvACCasa::GUS con mutantes en la señalización de auxinas para evaluar su papel en el transporte polar de auxinas.
- Clonar la región regulatoria de la ACCasa citosólica de Arabidopsis para evaluar su regulación.
- Analizar mutantes de la ACCasa citosólica de Arabidopsis cultivadas en presencia de malonato para revertir su fenotipo embrión-letal (patrón tejido-específico en condiciones normales y en respuesta a estrés).
- Generar anticuerpos contra la ACCasa citosólica tanto de frijol como de Arabidopsis, para identificar la presencia o acumulación de la proteína en diferentes tejidos ya sea por análisis tipo western o por inmunodetecciones *in situ*.

9. Referencias

- Aloni R, Schwalm K, Langhans M, Ullrich CI. 2003. Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *Planta* 216: 841-853
- Apel K, Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:373-399
- Bachmann A, Hause B, Maucher H, Garbe E, Voros K, Weichert H, Wasternack C, Feussner I. 2002. Jasmonate-induced lipid peroxidation in barley leaves initiated by distinct 13-LOX forms of chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 383: 1645-1657
- Baud S, Bellec Y, Miquel M, Bellini C, Caboche M, Lepiniec L, Faure JD, Rochat, C. 2004. *gurke* and *pasticcino3* mutants affected in embryo development are impaired in acetyl-CoA carboxylase. *EMBO Rep.* 5: 515-520
- Baud S, Guyon V, Kronenberger J, Wuilleme S, Miquel M, Caboche M, Lepiniec L, Rochat C. 2003. Multifunctional acetyl-CoA carboxylase I is essential for very long chain fatty acid elongation and embryo development in *Arabidopsis*. *Plant J.* 33: 75-86
- Beligni MV, Lamattina L. 2001. Nitric oxide in plants: The history is just beginning. *Plant Cell Environ.* 24:267-278
- Bell E, Creelman RA, Mullet JE. 1995. A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8675-8679
- Bell JN, Dixon RA, Bailey JA, Rowell PM, Lamb CJ. 1984. Differential induction of chalcone synthase mRNA activity at the onset of phytoalexin accumulation in compatible and incompatible plant-pathogen interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3384-3388
- Bergey DR, Howe GA, Ryan CA. 1996. Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12053-12058
- Berrocal-Lobo M, Molina A, Solano R. 2002. Constitutive expression of *ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1* in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J* 29: 23-32
- Bieza K, Lois R. 2001. An *Arabidopsis* mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. *Plant Physiol.* 126: 1105-1115

- Blechert S, Brodschelm W, Hölder S, Kammerer L, Kutchan TM, Müller MJ, Xia ZQ, Zenk MH. 1995. The ostadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 4099-4105
- Breusegem FV, Vranová E, Dat JF, Inzé D. 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science* 161: 405-414
- Brisson LF, Tenhaken R, Lamb C. 1994. Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plan Cell* 6: 1703-1712
- Brown DE, Rashotte AM, Murphy AS, Normanly J, Tague BW, Peer WA, Taiz L, Muday GK. 2001. Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126: 524-535
- Buer CS, Muday GK. 2004. The transparent testa4 mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of *Arabidopsis* roots to gravity and light. *Plant Cell* 16: 1191-1205
- Burbulis IE, Iacobucci M, Shirley BW. 1996. A null mutation in the first enzyme of flavonoid biosynthesis does not affect male fertility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 8: 1013-1025
- Buseman CM, Tamura P, Sparks AA, Baughman EJ, Maatta S, Zhao J, Roth MR, Esch SW, Shah J, Williams TD, Welti R. 2006. Wounding stimulates the accumulation of glycerolipids containing oxophytodienoic acid and dinor-oxophytodienoic acid in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology Preview*. Published on July 14, 2006, DOI:10.1104/pp.106.082115
- Bush DS. 1995. Calcium regulation in plant cells and its role in signalling. *Annu. Rev. of Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 46: 95-122
- Caffrey JJ, Choi JK, Wurtele ES, Nikolau BJ. 1998. Tissue distribution of acetyl-CoA carboxylase in leaves of leek (*Allium porrum* L.). *Journal of Plant Physiology* 153: 265-269
- Casimiro I, Marchant A, Bhalerao RP, Beeckman T, Dhooge S, Swarup R, Graham N, Inzé D, Sandberg G, Casero PJ, Bennett, M. 2001. Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* 13: 843-852
- Creelman RA, Tierney ML, Mullet JE. 1992. Jasmonic acid/methyljasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89: 4938-4941
- Dangl JL, Dietrich RA, Richberg MH. 1996. Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* 8: 1793-1807

- Del Pozo JC, Estelle M. 1999. The Arabidopsis cullin AtCUL1 is modified by the ubiquitin-related protein RUB1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 15342-15347
- Devoto A, Nieto-Rostro M, Xie D, Ellis C, Harmston R, Patrick E, Davis J, Sherratt L, Coleman M, Turner JG. 2002. COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in Arabidopsis. *Plant J.* 32: 457-466
- Dixon RA, Lamb CJ, Masoud S, Sewalt VJ, Paiva NL. 1996. Metabolic engineering: Prospects for crop improvement through the genetic manipulation of phenylpropanoid biosynthesis and defense responses—A review. *Gene* 179: 61-71
- Dixon RA, Pavia NL. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1085-1097
- Dröge-Laser W, Kaiser A, Lindsay WP, Halkier BA, Loake GJ, Doerner P, Dixon RA, Lamb C. 1997. Rapid stimulation of a soybean protein-serine kinase that phosphorylates a novel bZIP DNA-binding protein, G/HBF-1, during the induction of early transcription-dependent defenses. *EMBO J.* 16: 726–738
- Ebel J, Hahlbrock K. 1977. Enzymes of flavone and flavonol-glycoside biosynthesis. Coordinated and selective induction in cell-suspension cultures of *Petroselinum hortense*. *Eur. J. Biochem.* 75: 201-209
- Ebel J, Schaller-Hekeler B, Knobloch K-H, Wellman E, Grisebach H, Hahlbrock K. 1974. Coordinated changes in enzyme activities of phenylpropanoid metabolism during the growth of soybean cell suspension cultures. *Biochim. Biophys. Acta* 362: 417–424
- Ebel J, Schmidt WE, Loyal R. 1984. Phytoalexin synthesis in soybean cells: elicitor induction of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs and correlation with phytoalexin accumulation. *Arch Biochem Biophys.* 232: 240-248
- Estrada-Navarrete G, Alvarado-Affantranger X, Olivares JE, Díaz-Camino C, Santana O, Murillo E, Guillén G, Sánchez-Guevara N, Acosta J, Quinto C, Li D, Gresshoff PM, Sánchez F. 2006. *Agrobacterium rhizogenes* transformation of the *Phaseolus* spp.: A Tool for Functional Genomics. En prensa
- Eulgem T, Rushton PJ, Schmelzer E, Hahlbrook K, Somssich IE. 1999. Early nuclear events in plants defense: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *EMBO J.* 18: 4689-4699
- Faktor O, Loake G, Dixon RA, Lamb CJ. 1997. The G-box and H-box in a 39 bp region of a French bean chalcone synthase promoter constitute a tissue-specific regulatory element. *Plant J.* 11: 1105-1113
- Farmer EE, Ryan CA. 1992. Octadecanoid Precursors of Jasmonic Acid Activate the Synthesis of Wound-Inducible Proteinase Inhibitors. *Plant Cell* 4:129–134

- Feild TS, Lee DW, Holbrook NM. 2001. Why leaves turn red in autumn. The role of anthocyanins in senescing leaves of red-osier dogwood. *Plant Physiol.* 127: 566–574
- Feng S, Ma L, Wang X, Xie D, Dinesh-Kumar SP, Wei N, Deng XW. 2003. The COP9 signalosome interacts physically with SCF COI1 and modulates jasmonate responses. *Plant Cell* 15: 1083-1094
- Feys BJB, 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
- Flor HH. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol.* 9: 275-296
- Focke M, Gieringer E, Schwan S, Jansch L, Binder S, Braun H-P. 2003. Fatty acid biosynthesis in mitochondria of grasses: malonyl-coenzyme A is generated by mitochondrial-localized acetyl-coenzyme A carboxylase. *Plant Physiol.* 133: 875–884
- Friml J, Benková E, Mayer U, Palme K, Muster G. 2003. Automated whole mount localisation techniques for plant seedlings. *Plant J.* 34: 115-124
- Fritig B, Heitz T, Legrand M. 1998. Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Curr. Opin. Immunol.* 10: 16–22
- Galweiler L, Guan C, Muller A, Wisman E, Mendgen K, Yephremov A, Palme K. 1998. Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* 282: 2226-2230
- García-Ponce B, Rocha-Sosa M. 2000. The octadecanoid pathway is required for pathogen-induced multifunctional acetyl-CoA carboxylase accumulation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science* 157: 181-190
- García-Ponce B. 2000. Caracterización molecular de la respuesta a estres de la Acetil CoA Carboxilasa de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología-Universidad Nacional Autonoma de México. Cuernavaca, Mor.
- Gazzarrini S, McCourt P. 2003. Cross-talk in plant hormone signalling: What Arabidopsis mutants are telling us. *Annals of Botany* 91: 605-612
- Gilroy S, Read ND, Trewavas AJ. 1990. Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol triphosphate initiates stomatal closure. *Nature* 346: 769-771
- Goatley JL, Lewis RW. 1966. Composition of guttation fluid from rye, wheat, and barley seedlings. *Plant Physiol.* 41:373-375

- Grace SC, Logan BA. 2000. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philos T R Soc B*. 355: 1499-1510
- Grant JJ, Loake GJ. 2002. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signalling in disease resistance. *Plant Physiol*. 124: 21–29
- Gueguen V, Macherel D, Jaquinod M, Douce R, Bourguignon J. 2000. Fatty acid and lipoic acid biosynthesis in higher plant mitochondria. *J Biol Chem*. 275: 5016-5025
- Gundlach H, Muller MJ, Kutchan MJ, Zenk MH. 1992. JA is a signal transducer elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2389-2393
- Guyon V, Astwood J, Garner E, Dunker K, Taylor LP. 2000. Isolation and characterization of cDNAs expressed in the early stages of flavonol-induced pollen germination in petunia. *Plant Physiol*. 123: 699-710
- Hall AE, Findell JL, Schaller GE, Sisler EC, Bleecker AB. 2000. Ethylene perception by the ERS1 protein in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 123:1449–58
- Hammond-Kosack KE, Jones JD. G. 1996. Resistance gene-dependent plant defense response. *Plant Cell* 8: 1773-1791
- Hara K, Yagi M, Kusano T, Sano H. 2000. Rapid systemic accumulation of transcripts encoding atobacco WRKY transcription factor upon wounding. *Mol. Gen. Genet*. 263: 30-37
- Harborne JB, Williams CA. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481–504
- Harwood JL. 1988. Fatty acids metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 101-138
- Havaux M, Kloppstech K. 2001. The protective functions of carotenoid and flavonoid pigments against excess visible radiation at chilling temperature investigated in Arabidopsis *npq* and *tt* mutants. *Planta* 213: 953-966
- Hemm MR, Rider SD, Ogas J, Murry DJ, Chapple C. 2004. Light induces phenylpropanoid metabolism in *Arabidopsis* roots. *Plant J*. 38: 765–778
- Heo WD, Lee SH, Kim MC, Kim JC, Chung WS, Chun HJ, Lee KJ, Park CY, Park HC, Choi JY, Cho MJ. 1999. Involvement of specific calmodulin isoforms in salicylic acid-independent activation of plant disease resistance responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 766–771
- Hofmann R, Swinny E, Bloor S, Markham K, Ryan K, Cambell B, Jordan B, Fountain D. 2000. Responses of nine *Trifolium repens* L. populations to ultraviolet-B radiation:

- differential flavonol glycoside accumulation and biomass production. *Ann Bot.* 86: 527-537
- Huang DJ, Chen HJ, Lin CD, Lin YH. 2005. Antioxidant and antiproliferative activities of water spinach (*Ipomoea aquatica* Forsk) constituents *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46: 99-106
- Hugouvieux V, Barber CE, Daniels MJ. 1998. Entry of *Xanthomonas campestris* pv *campestris* into hydathodes of *Arabidopsis thaliana* leaves: A system for studying early infection events in bacterial pathogenesis. *MPMI.* 11: 537-543
- Jacobs M, Rubery PH. 1988. Naturally-occurring auxin transport regulators. *Science* 241: 346-349
- Jakobek JL, Lindgren PB. 1993. Generalized induction of defence responses in bean is not correlated with the induction of the hypersensitive reaction. *Plant Cell* 5: 49-56
- Jefferson RA. 1987. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5: 387-405
- Jenkins GI, Long JC, Wade HK, Shenton MR, Bibikova TN. 2001. UV and blue light signaling: pathways regulating chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis*. *New Phytol.* 151: 121-131
- Ke JS, Wen TN, Nikolau BJ, Wurtele ES. 2000. Coordinate regulation of the nuclear and plastidic genes coding for the subunits of the heteromeric acetyl-coenzyme A carboxylase. *Plant Physiol.* 122: 1057-1071
- Keen NT. 1990. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu Rev Genet.* 24: 447-463
- Kende H. 1993. Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 283-307
- Knoester M, Van Loon LC, Van Heuvel J, Bol JF, Linthorst HUM. 1998. Ethylene insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 95: 1933-1937
- Kobayashi H, Naciri-Graven Y, Beoughton WJ, Perret X. 2004. Flavonoids induce temporal shifts in gene-expression of nod-box controlled loci in *Rhizobium* sp. NGR234. *Mol Microbiol.* 51: 335-347
- Koes R, Quattrocchio F, Mol J. 1994. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: Function and evolution. *BioEssays* 16: 123-132

- Kolb CA, Käser MA, Kopeck J, Zotz G, Riederer M, Pfündel EE. 2001. Effects of natural intensities of visible and ultraviolet radiation on epidermal ultraviolet screening and photosynthesis in grape leaves. *Plant Physiol.* 127:863-875
- Konishi T, Shinohara K, Yamada K, Sasaki Y. 1996. Acetyl CoA carboxylase in higher plants: most plants other than gramineae have both the prokaryotic and the eukaryotic forms of this enzyme. *Plant Cell Physiol.* 37: 117-122
- Lamb CJ, Lawton MA, Dron M, Dixon RA. 1989. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell* 56:215–224
- Landry LG, Chapple CCS, Last RL. 1995. Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiol.* 109: 1159-1166
- Lawton MA, Lamb CJ. 1987. Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitor, wounding and infection. *Mol. Cell. Biol.* 7: 335-341
- Leon J, Rojo E, Titarenko E, Sanchez-Serrano JJ. 1998. Jasmonic acid-dependent and -independent wound signal transduction pathways are differentially regulated by Ca²⁺/calmodulin in Arabidopsis thaliana. *Mol Gen Genet.* 258: 412-419
- Lescot M, Dehais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouze P, Rombauts S. 2002. PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucl. Acids Res.* 30: 325-327
- Li J, Brader G, Palva ET. 2004. The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* 16: 319–331
- Li J, Ou-Lee T-M, Raba R, Admundson RG, Last RL. 1993. Arabidopsis flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell* 5: 171-179
- Li L, Zhao Y, McCaig BC, Wingerd BA, Wang J, Whalon ME, Pichersky E, Howe GA. 2004. The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *Plant Cell* 16:126-43
- Liu Y, Hoffman NE, Yang SF. 1983. Relationship between the malonation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and D-amino acids in mung-bean hypocotyls. *Planta* 158: 437-441
- Ljung K, Hull AK, Celenza J, Yamada M, Estelle M, Normanly J, Sandberg G. 2005. Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots. *Plant Cell* 17: 1090-1104

- Logemann E, Tavernaro A, Schulz W, Somssich IE, Hahlbrock K. 2000. UV light selectively co-induces supply pathways from primary metabolism and flavonoid secondary product formation in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:1903-1907
- Lois R, Buchanan BB. 1994. Severe sensitivity to ultraviolet radiation in an *Arabidopsis* mutant deficient in flavonoid accumulation. *Planta* 194: 504-509
- Lopez-Huertas E, Charlton WL, Johnson B, Graham IA, Baker A. 2000. Stress induces peroxisome biogenesis genes. *EMBO J.* 19: 6770–6777
- Lorenzo O, Chico JM, Sanchez-Serrano JJ, Solano R. 2004. *JASMONATE-INSENSITIVE1* encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 1938-1950
- Lorenzo O, Piqueras R, Sanchez-Serrano JJ, Solano R. 1993. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* 15: 165-178
- Mackerness S, Surplus SL, Blake P, John CF, Buchanan-Wollaston V, Jordan BR, Thomas B. 1999. Ultraviolet-B induced stress and changes in gene expression in *Arabidopsis thaliana*: role of signalling pathways controlled by jasmonic acid, ethylene and reactive oxygen species. *Plant Cell and Environm.* 22:1413–1423
- Malamy JE, Benfey PN. 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124: 33-44
- Marchant A, Kargul J, May ST, Muller P, Delbarre A, Perrot-Rechenmann C, Bennett MJ. 1999. AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO J.* 18: 2066–2073
- McDowell JM, Dangl JL. 2000. Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochem. Sci.* 25:79-82
- McKeon T, Fernández-Maculet JC, Yang SF. 1995. Biosynthesis and metabolism of ethylene. In PJ Davis, ed, *Plant Hormones and their role in Plant Growth and Development*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 118-139
- Menke FL, Champion A, Kijne JW, Memelink J. 1999. A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene *Str* interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor ORCA2. *EMBO J.* 18: 4455-4463
- Mergemann H, Sauter M. 2000. Ethylene induces epidermal cell death at the site of adventitious root emergence in rice. *Plant Physiol.* 124: 609–614
- Mo Y, Nagel C, Taylor LP. 1992. Biochemical complementation of chalcone synthase

- mutants defines a role for flavonols in functional pollen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7213-7217
- Muday GK, DeLong A. 2001. Polar auxin transport: Controlling where and how much. Trends Plant Sci. 6: 535-542
- Müller MJ, Brodschelm W, Spannagl E, Zenk MH. 1993. Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7490-7494
- Murphy A, Peer WA, Taiz L. 2000. Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. Planta 211: 315-324
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JDG. 2006. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. Science 312: 436-439.
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT. 2002. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. J. Exp. Bot. 53: 1237-47
- Niki T, Mitsuhashi I, Seo S, Ohtsubo N, Ohashi Y. 1998. Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. Plant Cell Physiol. 39: 500-507
- O'Donnell PJ, Calvert C, Atzorn R, Wasternack C, Leyser HMO, Bowles DJ. 1996. Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. Science 274: 1914-1917
- Olson PD, Varner JE. 1993. Hydrogen peroxide and lignification. Plant J. 4: 887-892
- Olsson LC, Veit M, Weissenböck G, Bornman JF. 1998. Differential flavonoid response to enhanced UV-B radiation in *Brassica napus*. Phytochemistry 49: 1021-1028
- Peck SC, Pawlowski K, Kende H. 1998 Asymmetric responsiveness to ethylene mediates cell elongation in the apical hook of peas. Plant Cell 10: 713-720
- Peer WA, Murphy AS, Brown DE, Tague BW, Muday GK, Taiz L. 2001. Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of Arabidopsis. Plnt physiol. 126: 536-548
- Penninckx IA, Thomma BP, Buchala A, Metraux JP, Broekaert WF. 1998. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. Plant Cell 10: 2103-2113
- Petersen M, Brodersen P, Naested H, Andreasson E, Lindhart U, Johansen B, Nielsen HB, Lacy M, Austin MJ, Parker JE, Sharma SB, Klessig DF, Martienssen R, Mattsson O,

- Jensen AB, Mundy J. 2000. Arabidopsis Map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* 103: 1111-1120
- Pitzschke A, Hirt H. 2006. Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling in plants. *Plant Physiol.* 141: 351-356
- Pollar MR, Stumpf PK. 1980. Biosynthesis of C20 and C22 fatty acids by developing seeds of *Limnanthes alba*. *Plant Physiol.* 66: 649-655
- Preston J, Wheeler J, Heazlewood, Li SF, Parish RW. 2004. AtMYB32 is required for normal pollen development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 40: 979-995
- Raz V, Fluhr R. 1992. Calcium requirement for ethylene-dependent responses. *Plan Cell* 4: 1123-1130
- Rocher A, Dumas C, Cock JM. 2005. A W- box is required for full expression of the SA-responsive gene SFR2. *GENE* 344:181-192
- Roesler KR, Savage LJ, Shintani DK, Shorrosh BS, Ohlrogge JB. 1996. Co-purification, co-immunoprecipitation, and coordinate expression of acetyl-coenzyme A carboxylase activity, biotin carboxylase, and biotin carboxyl carrier protein of higher plants. *Planta* 198: 517-525
- Royo E, Solano R, Sanchez-Serrano JJ. 2003. Interactions between signaling compounds involved in plant defense. *J. Plant Growth Reg.* 22: 82-98
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MO. 1996. Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8: 1809-1819
- Ryan K, Swinny E, Markham K, Winefield C. 2002. Flavonoid gene expression and UV photo protection in transgenic and mutant *Petunia* leaves. *Phytochemistry* 59: 23-32
- Ryder TB, Cramer CL, Bell JN, Robbins MP, Dixon RA, Lamb CJ. 1984. Elicitor rapidly induces chalcone synthase mRNA in *Phaseolus vulgaris* cell at the onset of the phytoalexin defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 5724-5728
- Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfett J, Guilfoyle T, Malamy J, Benfey P, Leyser O, Bechtold N, Weisbeek P, Scheres B. 1999. An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* 99: 463-472
- Sasaki Y, Hakamada K, Suama Y, Nagano Y, Furusawa I, Matsuno R. 1993. Chloroplast-encoded protein as a subunit of acetyl-Coa carboxylase in pea plant. *J. Biol Chem.* 268: 25118-25123
- Sasaki Y, Konishi T, Nagano Y. 1995. The compartmentation of Acetyl-Coenzyme A Carboxylase in plants. *Plant Physiol.* 108: 445-449

- Saslowsky D, Winkel-Shirley B. 2001. Localization of flavonoid enzymes in *Arabidopsis* roots. *Plant J.* 27: 37-48
- Schenk PM, Kazan K, Wilson I, Anderson JP, Richmond T, Somerville SC, Manners JM. 2000. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 11655–11660
- Schulte W, Topfer R, Stracke R, Schell J, Martini N. 1997. Multi-functional acetyl-CoA carboxylase from *Brassica napus* is encoded by a multi-gene family: Indication for plastidic localization of at least one isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3465-3470
- Schwalm K, Aloni R, Langhans M, Heller W, Stich S, Ullrich CI. 2003. Flavonoid-related regulation of auxin accumulation in *Agrobacterium tumefaciens*-induced plant tumors. *Planta* 218: 163–178
- Shorrosh BS, Dixon RA, Ohlrogge JB. 1994. Molecular cloning, characterization, and elicitation of acetyl-CoA carboxylase from alfalfa. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4323-4327
- Shulaev V, Silverman P, Raskin I. 1997. Airborne signaling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature* 385: 718-721
- Solano R, Stepanova A, Chao QM, Ecker JR. 1998. Nuclear events in ethylene signaling: A transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSEFACTOR1. *Genes Dev.* 12: 3703-3714
- Somssich IE, Hahlbrock K. 1998. Pathogen defense in plants-a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Sci.* 3: 86-90
- Staswick PE, Yuen GY, Lehman CC. 1998. Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *Plant J.* 15: 747-754
- Stintzi A, Weber H, Reymond P, Browse J, Farmer EE. 2001. Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 12837-12842
- Taki N, Sasaki-Sekimoto Y, Obayashi T, Kikuta A, Kobayashi K, Aina T, Yagi K, Sakurai N, Suzuki H, Masuda T, Takamiya K, Shibata D, Kobayashi Y, Ohta H. 2005. 12-oxo-phytodienoic Acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 139: 1268-1283
- Tattini M, Gravano E, Pinelli P, Mulinacci N, Romani A. 2000. Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* exposed to excess solar radiation. *New Phytol.* 148:69-77

- Thelen JJ, Mekhedov S, Ohlrogge JB. 2001. Brassicaceae express multiple isoforms of biotin carboxyl carrier protein in a tissue-specific manner. *Plant Physiol.* 125: 2016-2028
- Thomma BP, Eggermont K, Tierens KF, Broekaert WF. 1999. Requirement of Functional *Ethylene-Insensitive 2* Gene for Efficient Resistance of Arabidopsis to Infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* 121: 1093-1101
- Tiryaki I, Staswick PE. 2002. An Arabidopsis mutant defective in jasmonate response is allelic to the auxin-signaling mutant *axr1*. *Plant Physiol.* 130: 887-894
- Tong L. 2005. Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery. *Cell. Mol. Life Sci.* 62: 1784-1803
- Torres MA, Jones JDG, Dangl JL. 2005. Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* 37: 1130-1134
- Turner JG, Ellis C, Devoto A. 2002. The jasmonate signal pathway. *Plant Cell (Suppl)* 14: S153–S164
- Van der Fits L, Memelink J. 2000. ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science* 289: 295–297
- Van der Meer IM, Stam ME, Van Tunen AJ, Mol JN, Stuitje AR. 1992. Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in petunia anthers results in male sterility. *Plant Cell* 4: 253-262
- VanEtten HD, Mansfield JW, Bailey J and Farmer EE. 1994. Letter to the editor: two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus phytoanticipins. *Plant Cell.* 1191-1992
- Vijayan P, Shockey J, Lévesque CA, Cook RJ, Browse J. 1998. A role for jasmonate in pathogen defense of Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7209-7214
- Walker AR, Davison PA, Bolognesi-Winfield AC, James CM, Srinivasan N, Blundell TL, Esch JJ, Marks MD, Gray JC. 1999. The *TRANSPARENT TESTA GLABRA 1* locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanine biosynthesis in Arabidopsis, encodes a WD40 repeat protein. *Plant Cell* 11: 1337-1350
- Wasternack C, Parthier B. 1997. Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends Plant sci.* 2: 302-307
- Watanabe T, Seob S, Sakai S. 2001. Wound-induced expression of a gene for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and ethylene production are regulated by both reactive oxygen species and jasmonic acid in *Cucurbita maxima*. *Plant Physiol. Biochem.* 39: 121-127

- Weiss MR. 1991. Floral color changes as cues for pollinators. *Nature* 354: 227-229
- Winkel-Shirley B. 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiol.* 126: 485-493
- Winkel-Shirley B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol.* 5: 218-223
- Xiao S, Dai L, Liu F, Wang Z, Peng W, Xie D. 2004. *COS1*: An *Arabidopsis coronatine insensitive1* suppressor essential for regulation of jasmonate-mediated plant defense and senescence. *Plant Cell* 16: 1132–1142
- Xie DX, Feys BF, James S, Nieto-Rostro M, Turner JG. 1998. *COI1* : an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* 280: 1091-1094
- Xu L, Liu F, Lechner E, Genschik P, Crosby WL, Ma H, Peng W, Huang D, Xie D. 2002. The SCF (*COI1*) ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 1919-1935
- Xu Y, Chang PF, Liu D, Narasimhan ML, Raghothama KG, Hasegawa PM, Bressan RA. 1994. Plant defense genes are synergically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell* 6: 1077-1085
- Yamasaki H, Sakihama Y, Ikehara N. 1997. Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant Physiol.* 115: 1405-1412
- Yanai Y, Kawasaki T, Shimada H, Wurtele ES, Nikolau BJ, Ichikawa N. 1995. Genomic organization of 251 kDa acetyl-CoA carboxylase genes in *Arabidopsis*: tandem gene duplication has made two differentially expressed isozymes. *Plant Cell Physiol.* 36: 779–787
- Yang P, Chen Ch, Wang Z, Fan B, Chen Z. 1999. A pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding activity recognizes the elicitor response element of the tobacco class I chitinase gene promoter. *Plant J.* 18: 141-149
- Zhao XC, Qu X, Mathews DE, Schaller GE. 2002. Effect of ethylene pathway mutations upon expression of the ethylene receptor *ETR1* from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 130: 1983–1991
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W. 2004. GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* Microarray Database and Analysis Toolbox. *Plant Physiol.* 136: 2621-2632
- Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley EJ, Jones JDG, Felix G, Boller T. 2004. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception *Nature* 428: 764-767