

00361



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

ANALISIS DE LA EXPRESION DE GENES DE LA VIA
DE LAS LIPOXIGENASAS EN RESPUESTA A LA
HERIDA MECANICA Y AL HONGO *Alternaria*
brassicicola EN *Arabidopsis thaliana*

T E S I S

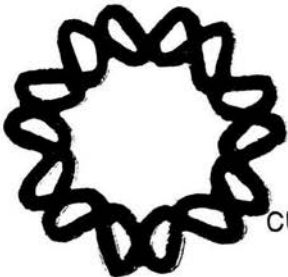
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

BIOL. JULIO CESAR AMEZCUA ROMERO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. HELENA PORTA DUCOING



CUERNAVACA, MORELOS.

ABRIL 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

*La prosperidad no existe
sin temores ni disgustos, ni
la adversidad sin consuelos
ni esperanzas.*

Francis Bacon

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser ese gran amigo que siempre esta conmigo.

A mis padres (José y Evangelina) por todo su amor y apoyo durante toda mi vida. Los amo.

A la UNAM por permitirme ser parte de ella y proporcionarme todo lo necesario para realizar la maestría.

Al CONACYT por la beca crédito que me otorgó.

Al Dr. Mario Rocha Sosa por haberme aceptado en su grupo de trabajo.

A la Dra. Helena Porta Ducoing por haber sido mi directora de tesis y por apoyarme siempre que lo necesitaba.

Al Dr. Alejandro Alagón Cano y a la Dra. Patricia León Mejía por sus comentarios y sugerencias al formar parte de mi comité tutorial.

A la Dra. Adriana Garay Arroyo, a la Dra. Rosario Vera Estrella, al Dr. David Romero Camarena y al Dr. Javier Plasencia de la Parra por haber aceptado formar parte de mi jurado de examen para la obtención de grado y por haber revisado la tesis.

A la Bióloga Patricia Rueda Benítez, a la Secretaria Adriana Monserrat, a la Laboratorista Martha Trujillo Jiménez y a la Sra. Lourdes Cazadero por el gran apoyo técnico que recibí de su parte. Muchas gracias.

A Paty, Tere, Adriana Monserrat y Baldemar por todas las emociones compartidas. Gracias por su apoyo y por aguantarme.

A los del equipo de voley ball (Arturo, Rossy, Alex, Baldemar, Maricela, Eli) por los momentos de alegría y de enojo que compartimos.

A todos los integrantes de los grupos Rocha y León por hacer un ambiente de trabajo cordial y por las reuniones compartidas.

A Lolo y a Sara por todo su apoyo y cariño, y por haberme dado la felicidad de ser tío de una pequeña preciosa (Mariajose).

A Iskra por todo su amor, comprensión y apoyo.

A todos mis tíos y primos por su afecto y apoyo.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	6
Mecanismos de defensa de las plantas	6
Defensas constitutivas	6
Defensas inducidas	6
La actividad de las lipoxigenasas	7
Especificidad de los sustratos	9
Localización intracelular	9
Dominios conservados	9
Funciones fisiológicas de las lipoxigenasas	11
Funciones de los productos derivados del metabolismo de las lipoxigenasas	12
Desarrollo y crecimiento	12
Defensa contra la herida y el ataque por herbívoros	12
Defensa contra el ataque por patógenos	15
ANTECEDENTES	16
La vía de las lipoxigenasas en <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
Los ácidos grasos octadecatrienoico (ácido α -linolénico, 18:3), hexadecatrienoico (16:3) y monogalactosil diglicérido	16
Lipoxigenasas	19
Hidroperóxido liasa	19
Aleno óxido sintasa	20
Aleno óxido ciclasa	21
12-oxo-fitodienoato reductasa	21
β -oxidación	22
Metiltransferasa del ácido jasmónico	22
JUSTIFICACIÓN	23
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Plantas y condiciones de crecimiento	25
Oligonucleótidos	26
Extracción de DNA genómico	27
Cuantificación de DNA y RNA	27
Reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR)	27
Análisis de restricción con nucleasas	29
Tratamientos aplicados a las plantas	29

Extracción de RNA total	30
Transcripción reversa mediante reacción en cadena de la DNA polimerasa (RT-PCR)	30
Transferencia de RNA desde geles a membranas de nylon (Northern blot)	31
Marcaje de sonda e hibridación a RNA fijado a membrana	31
Extracción de proteínas totales	32
Extracción de cloroplastos	32
Cuantificación de proteínas	33
Transferencia de proteínas desde geles de poliacrilamida-SDS a filtros de membrana: detección inmunológica de proteínas inmovilizadas (Western blot)	33
RESULTADOS	35
Los oligonucleótidos diseñados amplifican de manera específica a cada uno de los genes mediante PCR	35
La herida mecánica induce la acumulación del mRNA de <i>AtLOX3</i> pero no induce la acumulación de los mRNAs de <i>AtLOX4</i> y <i>AtLOX6</i>	36
La acumulación del mRNA de los genes <i>HPL</i> , <i>AtLOX2</i> y <i>AtLOX3</i> , y <i>AOS</i> es dependiente, codependiente e independiente, respectivamente, del ácido jasmónico producido <i>in planta</i> en respuesta a la herida	38
Los compuestos volátiles metil jasmonato y trans-2-hexenal inducen la acumulación de los transcritos de los genes <i>AtLOX2</i> , <i>AtLOX3</i> , <i>AtLOX6</i> , <i>AOS</i> y <i>HPL</i>	40
El hongo necrotrófico <i>Alternaria brassicicola</i> induce la acumulación de los transcritos de los genes <i>AtLOX2</i> y <i>AOS</i>	42
La acumulación constitutiva de AOS es independiente de <i>AtLOX2</i> y del ácido jasmónico producido <i>in planta</i> en respuesta a la herida	43
COI1 regula positivamente la acumulación de AOS en la respuesta de defensa de <i>Arabidopsis thaliana</i> a la herida mecánica	46
Detección inmunológica de AtLOX y AOS en extractos de cloroplastos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	47
RESULTADOS COMPLEMENTARIOS	49
DISCUSIÓN	50
Respuesta de los genes de la vía de las lipoxigenasas a la herida	50
Respuesta de los genes de la vía de las lipoxigenasas a los compuestos volátiles metil jasmonato y trans-2-hexenal	51
Respuesta de los genes de la vía de las lipoxigenasas al hongo necrotrófico <i>Alternaria brassicicola</i>	52
Análisis de las proteínas AtLOX y AOS en respuesta a la herida	53
Detección inmunológica de las proteínas AtLOX y AOS en extractos de cloroplastos	54
CONCLUSIONES	55
PERSPECTIVAS	56
BIBLIOGRAFÍA	57
APÉNDICE	62

ÍNDICE DE FIGURAS

No.	Pie de figura	Pág.
1	Reacción de las lipoxigenasas sobre el ácido α -linolénico y especificidad de la dioxigenación.	8
2	La vía de las lipoxigenasas.	8
3	Dominios estructurales conservados en las lipoxigenasas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	10
4	Funciones de las lipoxigenasas durante la vida de la planta.	14
5	La vía de las lipoxigenasas en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	18
6	Oligonucleótidos usados.	26
7	Amplificación de los genes <i>AOS</i> , <i>HPL</i> , <i>AtLOX2</i> , <i>AtLOX3</i> , <i>AtLOX4</i> y <i>AtLOX6</i> a partir de DNA genómico y análisis de restricción con endonucleasas.	36
8	Análisis de la acumulación del mRNA de los genes <i>AtLOX2</i> , <i>AtLOX3</i> , <i>AtLOX4</i> , <i>AtLOX6</i> , <i>AOS</i> y <i>HPL</i> en plantas silvestres de <i>A. thaliana</i> heridas.	37
9	La acumulación de los transcritos de los genes <i>HPL</i> , <i>AtLOX3</i> y <i>AOS</i> en respuesta a la herida es dependiente, codependiente e independiente, respectivamente, de la producción <i>in planta</i> del JA inducida por la herida.	39
10	La acumulación de los mRNAs de los genes <i>HPL</i> , <i>AtLOX2</i> y <i>AtLOX3</i> , y <i>AOS</i> en respuesta a la herida es dependiente, codependiente e independiente, respectivamente, de la percepción del JA por la planta.	39
11	Los genes <i>AtLOX2</i> , <i>AtLOX3</i> , <i>AtLOX6</i> , <i>AOS</i> y <i>HPL</i> responden transcripcionalmente al compuesto volátil metil jasmonato.	41
12	Los genes <i>AtLOX2</i> , <i>AtLOX3</i> , <i>AtLOX6</i> , <i>AOS</i> y <i>HPL</i> responden transcripcionalmente al compuesto volátil trans-2-hexenal.	41
13	El hongo necrotrófico <i>Alternaria brassicicola</i> induce la expresión de los genes <i>AtLOX2</i> y <i>AOS</i> .	43
14	Western blot de las proteínas AtLOX y AOS en plantas silvestres de <i>A. thaliana</i> heridas.	45
15	Western blot de las proteínas AtLOX y AOS en plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i> con cosupresión de <i>AtLOX2</i> en respuesta a la herida mecánica.	45
16	La proteína COI1 es requerida para mantener los niveles de acumulación de las enzimas AtLOX y AOS en la respuesta de <i>A. thaliana</i> a la herida mecánica.	47
17	Detección inmunológica de AtLOX y AOS en extractos de cloroplastos de plantas silvestres de <i>A. thaliana</i> .	48
18	Análisis de la respuesta de los genes <i>AtLOX2</i> , <i>AtLOX3</i> , <i>AtLOX4</i> , <i>AtLOX6</i> , <i>AOS</i> y <i>HPL</i> al etanol.	49

ÍNDICE DE TABLAS

<u>No.</u>	<u>Título</u>	<u>Pág.</u>
I	Productos del metabolismo de las lipoxigenasas con una actividad propuesta o conocida.	14
II	Identities entre los cDNAs de las lipoxigenasas de <i>Arabidopsis thaliana</i> que presentan un péptido de tránsito hacia el cloroplasto.	35
III	Identities y similitudes entre las secuencias de aminoácidos de las lipoxigenasas de <i>A. thaliana</i> y de <i>S. tuberosum</i> que presentan un péptido de tránsito hacia el cloroplasto.	44

RESUMEN

Las lipoxigenasas (LOXs) son enzimas con hierro no-hemo ampliamente distribuidas en las plantas. Estas enzimas catalizan la dioxigenación de los ácidos grasos poli-insaturados que presentan un sistema (1Z, 4Z)-pentadieno, tales como los ácidos linoleico y α -linolénico, para producir hidroperóxidos de ácidos grasos. Los hidroperóxidos producidos de ésta manera, sirven de sustrato para varias enzimas, entre las que se encuentran la aleno óxido sintasa (AOS) y la hidroperóxido liasa (HPL), a partir de las cuales se derivan compuestos importantes para los procesos de señalización y de defensa de las plantas en respuesta a la herida y a fitopatógenos, tales como el ácido jasmónico (JA) y el metil jasmonato (MeJA), y el trans-2-hexenal, respectivamente.

De los cuatro genes de *Arabidopsis thaliana* (*AtLOX2*, *AtLOX3*, *AtLOX4* y *AtLOX6*) que codifican para LOXs con péptido de tránsito hacia el cloroplasto, sólo se ha caracterizado al gen *AtLOX2*, el cual se induce en respuesta a la herida y al MeJA. Además se ha demostrado que la enzima *AtLOX2* es necesaria para la síntesis del JA en respuesta a la herida. Por otra parte, se ha observado que la infección de plantas silvestres de *A. thaliana* con el hongo fitopatógeno *Alternaria brassicicola* incrementa los niveles endógenos de JA. Por lo tanto, para estudiar la regulación de la expresión de los genes *AtLOX2*, *AtLOX3*, *AtLOX4*, *AtLOX6*, AOS y HPL, analizamos la acumulación de sus transcritos en respuesta a la herida, a los compuestos volátiles MeJA y trans-2-hexenal, y al hongo *A. brassicicola* en plantas silvestres de *A. thaliana* mediante RT-PCR y Northern blot. También analizamos la expresión de estos genes en plantas cosupresoras de *AtLOX2* (incapaces de producir JA en respuesta a la herida) y en plantas mutantes *coi1-1* (insensibles al JA) inducidas por la herida.

Nuestros resultados mostraron que *AtLOX3* respondió a la herida y que la acumulación de su transcrito junto con el de *AtLOX2*, dependen parcialmente de la percepción del JA por la planta. Además, observamos que la expresión de HPL inducida por la herida depende totalmente del JA producido en respuesta a dicho estrés, mientras que la expresión de AOS en respuesta a la herida es independiente del JA. Por su parte, el MeJA y el trans-2-hexenal indujeron la expresión de los genes *AtLOX3*, *AtLOX6*, y HPL. En respuesta al hongo *A. brassicicola* observamos sólo la expresión de los genes *AtLOX2* y AOS, los cuales participan en la síntesis del JA. También se analizó la acumulación de las proteínas AtLOX y AOS en respuesta a la herida mediante Western blot. Encontramos una acumulación constitutiva de ambas proteínas tanto en plantas sin herir como heridas, además de un enriquecimiento de éstas en extractos de cloroplastos. Sin embargo, los resultados obtenidos de las mutantes *coi1-1* mostraron que la acumulación de AOS inducida por la herida depende de la proteína COI1. Por lo tanto, se tiene que los genes de la vía de las LOXs se expresan y se regulan diferencialmente en respuesta a la herida y al hongo *A. brassicicola*.

INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos sésiles anclados al suelo mediante un sistema de raíces que les permite adquirir nutrientes y agua, por lo cual se encuentran desprovistas de movimiento alguno que les permita eludir los daños ocasionados por microbios, insectos o herbívoros vertebrados. Para defenderse, las plantas han desarrollado estrategias de supervivencia que les permiten adaptarse a los estrés ambientales tanto bióticos (virus, bacterias, hongos, plantas, animales) como abióticos (herida mecánica, sequía, salinidad, temperatura) a los cuales se encuentran expuestas ordinariamente. Dichas estrategias de supervivencia incluyen la alteración de procesos morfológicos, fisiológicos y del desarrollo en respuesta tanto a señales internas derivadas de la planta como a señales externas provenientes del ambiente, las cuales determinan finalmente las respuestas de defensa intra- e intercelulares de las plantas.

MECANISMOS DE DEFENSA DE LAS PLANTAS

En común con otros organismos sésiles o de movimiento lento (anfibios, esponjas marinas, corales), las plantas han desarrollado mecanismos de defensa constitutivos e inducidos que les permiten rechazar, inhibir o matar a sus enemigos (Wink, 2003), tales como los que se describen a continuación.

Defensas constitutivas

Las defensas constitutivas son aquellos rasgos inherentes de las plantas que les sirven como una primera barrera de defensa contra los estrés abióticos y contra los ataques por microorganismos patogénicos, insectos y herbívoros vertebrados. Las espinas, los tricomas y la cutícula forman parte de las barreras físicas de las plantas que restringen el acceso de las plagas a las partes más nutritivas de éstas y les permiten soportar exitosamente la agresión por herbívoros pequeños (Kessler y Baldwin, 2002). Además, las plantas también cuentan con metabolitos secundarios constitutivos, tales como la nicotina (alcaloide), los cardenólidos (terpenos) y el ácido clorogénico (compuesto fenólico), los cuales actúan como insecticida, como compuestos tóxicos para los herbívoros vertebrados y como agente antimicrobiano, respectivamente (Croteau *et al.*, 2000; Dixon, 2001).

Defensas inducidas

Las defensas inducidas son aquellas respuestas de las plantas que aparecen sólo cuando éstas reconocen a algún factor biótico o abiótico en particular. Entre los

productos que forman parte de la respuesta de defensa inducida de las plantas se encuentran proteínas tales como las inhibidoras de proteasas (PINI y PINII; Peña-Cortes *et al.*, 1995) y la enzima polifenol oxidasa, las cuales protegen a las plantas de las proteasas digestivas de los insectos herbívoros (Noordermeer *et al.*, 2001). Además, diversos metabolitos secundarios también forman parte de la respuesta de defensa inducida de las plantas, entre los que se encuentran los estilbenos (compuestos fenólicos), el capsidiol (terpeno) y la berberina (alcaloide), los cuales actúan como insecticidas, como fitoalexina y como agente antimicrobiano, respectivamente (Croteau *et al.* 2000; Dixon, 2001).

La respuesta de defensa inducida se basa principalmente en la activación transcripcional de genes, la cual ocurre como resultado de una compleja y diversa red de transducción de señales (Noordermeer *et al.*, 2001). Entre éstas señales se encuentran aquellas derivadas de la peroxidación de lípidos catalizada por las lipoxigenasas (Weber, 2002), cuya reacción deviene en la producción de oxilipinas (compuestos cíclicos o acíclicos oxidados derivados del catabolismo de los ácidos grasos que regulan procesos tanto de defensa como del desarrollo de las plantas (Creelman y Rao, 2002)) tales como la hormona ácido jasmónico (JA), los compuestos volátiles metil jasmonato (MeJA) y trans-2-hexenal, entre otros (Creelman y Mullet, 1997; Farmer, 2001).

LA ACTIVIDAD DE LAS LIPOXIGENASAS

Las lipoxigenasas (LOXs) constituyen una familia génica de dioxigenasas con hierro no-hemo ampliamente distribuidas en plantas y animales. Éstas enzimas catalizan la dioxigenación regio- y estéreo-específica de los ácidos grasos poli-insaturados (PUFAs) que presentan un sistema (1Z,4Z)-pentadieno, tales como los ácidos linoleico (LA, 18:2) y α -linolénico (α -LeA, 18:3) en las plantas (Figura 1), y el ácido araquidónico (20:4) en los animales (Siedow, 1991; Porta y Rocha-Sosa, 2002).

Las LOXs de las plantas se clasifican como 9- o 13-LOXs de acuerdo con la posición en el ácido graso donde introducen al oxígeno molecular (Figura 1). De ésta manera, se tienen a los ácidos 9- y 13-hidroperoxioctadecadienoicos (9-, 13-HPOD) y 9- y 13-hidroperoxioctadecatrienoicos (9-, 13-HPOT) como productos de la reacción de las LOXs sobre los ácidos linoleico y α -linolénico, respectivamente (Feussner y Wasternack, 2002). Éstos hidroperóxidos derivados de las reacciones de las LOXs sirven de sustrato para varias enzimas, las cuales convierten a dichos compuestos en oxilipinas útiles para la planta (Figura 2 y Tabla I).

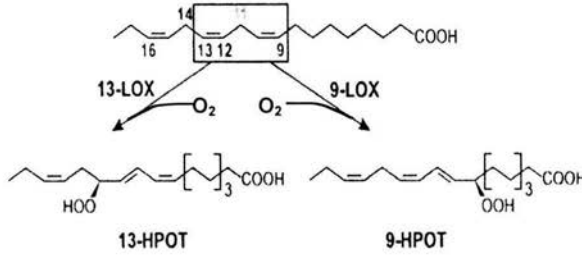


Figura 1. Reacción de las lipoxigenasas sobre el ácido α -linolénico y especificidad de la dioxigenación (modificada de Feussner y Wasternack, 2002).

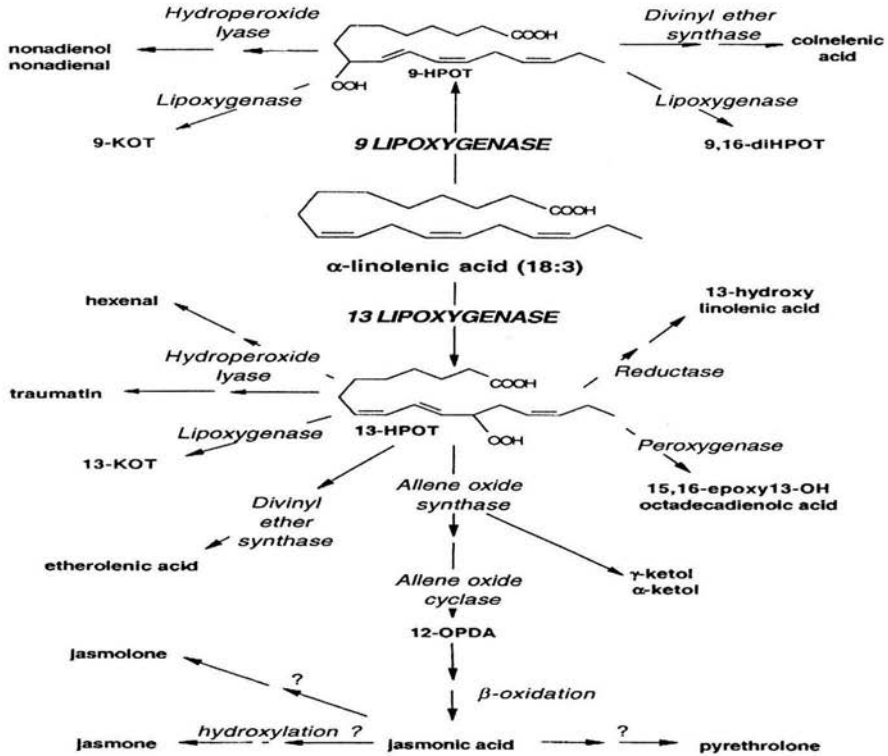


Figura 2. La vía de las lipoxigenasas. La dioxigenación de los ácidos grasos (tal como el ácido α -linolénico, 18:3) catalizada por 9- y 13- LOXs resulta en la producción de compuestos con diversas funciones en las plantas (Tabla I; Porta y Rocha-Sosa, 2002).

Especificidad de los sustratos

La mayoría de las LOXs de las plantas prefieren a los ácidos grasos libres como sustratos (Siedow, 1991). Sin embargo, se ha demostrado que dos 13-LOXs, la LOX1 de las semillas de soya y una LOX de las raíces de pepino, muestran actividad con PUFAs esterificados a los fosfolípidos (Matsui *et al.*, 1998; Feussner y Wasternack, 2002), involucrando la actividad de las LOXs sobre las membranas. Además, se ha descrito la actividad de otras LOXs, tales como la LOX de los cuerpos lipídicos de pepino, la 13-LOX de las plántulas de cebada y la LOX vegetativa de las hojas de soya, con PUFAs esterificados en lípidos neutrales, tales como los triglicéridos (Feussner *et al.*, 1998; Feussner y Wasternack, 2002), implicando a estas LOXs en el catabolismo de dichos lípidos.

Localización intracelular

Se han observado paralelamente LOXs citosólicas y vacuolares en las hojas de la cebada y de la soya, y en el fruto del pepino (Fischer *et al.*, 1999; Tranbarger *et al.*, 1991). En los cotiledones del pepino y de la soya, además de las LOXs solubles, se encontraron LOXs asociadas a las membranas microsomales y a los cuerpos lipídicos (Matsui *et al.*, 1992). En plantas como la espinaca, la cebada y el chícharo, se ha detectado a las LOXs preferentemente dentro de las membranas de los cloroplastos de las hojas (Feussner *et al.*, 1995). Aunque la mayoría de las LOXs se encontraron en el estroma, al menos en la espinaca se detectó la actividad de LOX dentro de la fracción membranosa (Blée y Joyard, 1996). Además, el análisis de la expresión temporal y espacial de las LOXs asociadas con los cuerpos lipídicos y con los cloroplastos, mostró la participación de éstas LOXs en el metabolismo de los lípidos de almacenamiento (Feussner *et al.*, 2001) y en la formación del ácido jasmónico (Bell *et al.*, 1995), respectivamente. De ésta manera, es posible que las distintas LOXs tengan una localización intracelular específica, lo cual contribuiría con una diferenciación temporal y espacial de la actividad de éstas enzimas para la formación de los hidroperóxidos derivados de los PUFAs, los cuales son subsecuentemente canalizados dentro de ramas diferentes de la vía de las LOXs.

Dominios conservados

La cristalización de la LOX1 de soya mostró que esta enzima contiene dos dominios estructurales: un barril β de 146 residuos y un conjunto helicoidal de 693 residuos. Además, se encontró al átomo de hierro en el centro del dominio más grande y se observó que está coordinado por tres histidinas y por el COO- del extremo carboxilo terminal (Boyington *et al.*, 1993). Los análisis de las secuencias de aminoácidos de LOXs de papa (Royo *et al.*, 1996), de pepino (Matsui *et al.*, 1999) y de frijol (Porta y Rocha-Sosa, 2000), han mostrado que las características estructurales encontradas en la LOX de soya se encuentran conservadas también en estas plantas.

Además, mediante una búsqueda de dominios conservados en las LOXs de *A. thaliana* realizada en el sitio del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), se identificaron a dos dominios estructurales: el PLAT o LH2 y el de lipoxigenasa (Figura 3), lo cuales se corresponden con el barril β y el conjunto helicoidal, respectivamente, encontrado en la LOX1 de soya.

El dominio PLAT (Policistina-1, Lipoxigenasa, Alfa-Toxina) o LH2 (Homología con Lipoxigenasa) consiste de un barril β compuesto por ocho hebras. Este dominio se identifica en dos subgrupos muy similares estructuralmente, las lipoxigenasas y las lipasas. Sin embargo, mientras que en las lipoxigenasas el dominio PLAT se encuentra en el extremo amino terminal, en las lipasas se encuentra en el extremo carboxilo terminal. Se ha mostrado que el dominio PLAT de la lipasa pancreática media la asociación de ésta enzima con la membrana. Además, también se ha demostrado que el barril β de la lipoxigenasa de los cuerpos lipídicos de pepino media la unión de ésta enzima a los liposomas y a los cuerpos lipídicos (May *et al.*, 2000). Así, tal parece que se necesita de este dominio para que ambos tipos de enzimas puedan acceder a sus sustratos de membrana.

Por su parte, el dominio de lipoxigenasa está compuesto por un conjunto helicoidal y consta de una región de 664 residuos en la cual se presentan las mayores identidades y similitudes entre las secuencias de aminoácidos de las LOXs.

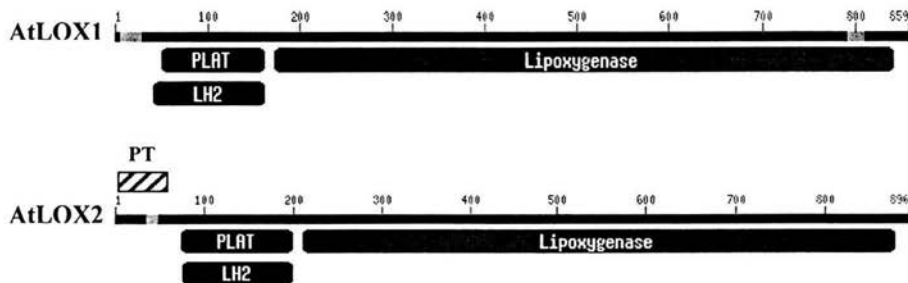


Figura 3. Dominios estructurales conservados en las lipoxigenasas de *Arabidopsis thaliana*. Dominios PLAT (Policistina-1, Lipoxigenasa, Alfa-Toxina) o LH2 (Homología con Lipoxigenasa), y de Lipoxigenasa conservados en las proteínas AtLOX1 citosólica y AtLOX2 cloroplástica. PT: péptido de tránsito hacia el cloroplasto.

FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LAS LIPOXIGENASAS

Las LOXs se han asociado con varios procesos en las diversas etapas del desarrollo de las plantas, desde los estadios de semilla hasta la germinación y el crecimiento vegetativo (Siedow, 1991; Kolomiets *et al.*, 2001). Además, también se ha asociado la participación de las LOXs en los mecanismos de defensa de las plantas (Figura 4; Porta y Rocha-Sosa, 2002).

Las LOXs se encuentran presentes normalmente en las semillas de las plantas (Siedow, 1991), por lo cual se cree que pueden funcionar como proteínas de almacenamiento. En las semillas en germinación del pepino se ha visto que una LOX asociada con los cuerpos lipídicos oxigena a los ácidos grasos esterificados, los cuales una vez oxigenados, son cortados preferentemente para ser liberados en el citosol, donde son metabolizados posteriormente vía la β -oxidación (Feussner *et al.*, 2001). Contrariamente a lo que ocurre en el pepino, las LOXs de las semillas y de las plántulas de soya no se encuentran asociadas con los cuerpos lipídicos. Además, tampoco ocurre una oxigenación importante de los ácidos grasos poli-insaturados en las plántulas en germinación de la soya, lo cual sugiere que ésta planta no utiliza a las LOXs para la movilización de lípidos durante la germinación (Wang *et al.*, 1999).

El tejido vegetativo de las plantas sintetiza proteínas de almacenamiento vegetativo (VSP) diferentes de las proteínas de almacenamiento encontradas en las semillas. La síntesis de VSPs se regula durante el desarrollo en función de la necesidad de almacenar nitrógeno en exceso, y la acumulación de sus productos responde a la relación suministro/captación. Se han identificado a varias VSPs como LOXs que se acumulan en las hojas de la soya en respuesta a la limitación en la captación de nutrientes (Fischer *et al.*, 1999). Además, las paredes de las vainas de la soya funcionan como un reservorio importante de nutrientes para las semillas en desarrollo. Se ha visto que dichas paredes acumulan cantidades altas de LOXs y VSPs durante el desarrollo, y se ha demostrado que estas proteínas son las primeras en disminuir su concentración durante el desarrollo de las semillas (Dubbs y Grimes, 2000), confirmando la importancia de su almacenamiento.

La implicación de una LOX, la AtLOX2 de *Arabidopsis thaliana*, en la biosíntesis del JA inducida por la herida se demostró en plantas cosupresoras del gen AtLOX2. Estas plantas cosupresoras no muestran un fenotipo visible diferente al observado en las plantas silvestres, sin embargo, son incapaces de acumular JA en respuesta a la herida. No obstante, el nivel basal del JA no se encuentra alterado. Además, estas plantas muestran una expresión muy reducida de genes inducidos por el JA y por la herida, tal como el VSP1 que codifica para una proteína de almacenamiento vegetativo (Bell *et al.*, 1995).

FUNCIONES DE LOS PRODUCTOS DERIVADOS DEL METABOLISMO DE LAS LIPOXIGENASAS

En las plantas, los productos de la vía de las LOXs tienen funciones muy diversas, encontrándose su participación en varios procesos del crecimiento y del desarrollo, e importantemente en las respuestas de defensa de las plantas (Tabla I y Figura 4).

Desarrollo y crecimiento

En las plantas transgénicas de papa que expresan al gen *POTLX-1* en antisentido se observa, además de una actividad de LOX reducida, un efecto muy drástico en la producción de los tubérculos, pues estos son deformes y pequeños. Estos resultados sugieren que las LOXs están involucradas en el control del crecimiento y del desarrollo del tubérculo, probablemente mediante la síntesis de oxilipinas que regulan el crecimiento celular durante la formación del tubérculo (Kolomiets *et al.*, 2001).

El JA y el MeJA (colectivamente llamados jasmonatos), modulan la expresión de numerosos genes e influyen aspectos específicos del crecimiento y del desarrollo de las plantas. Los jasmonatos inhiben la germinación del polen (*A. thaliana*) y de las semillas (*Quercus robur*), así como el crecimiento de las raíces (*A. thaliana*) y la expresión de genes del aparato fotosintético (cebada), sin embargo, se requieren para la tuberización (papa), la maduración de frutos (tomate), la producción de polen viable (*A. thaliana*) y la dehiscencia de la antera (*A. thaliana*) (Creelman y Mullet, 1997; Devoto y Turner, 2003).

Defensa contra la herida y el ataque por herbívoros

Los jasmonatos y los aldehídos- y alcoholes-C6 modulan la expresión de varios genes de defensa e influyen aspectos específicos de las respuestas de las plantas a la herida y a los insectos (Tabla I; Creelman y Mullet, 1997; Turner *et al.*, 2002).

El JA y el ácido oxo-fitodienoico (OPDA), derivados de la rama de la aleno óxido sintasa (AOS), actúan como moléculas señal y se ha visto que sus niveles se incrementan en respuesta a la herida (Bell *et al.*, 1995; Stintzi *et al.*, 2001). El JA activa genes que codifican para enzimas inhibitoras de proteasas (PIN) y para la enzima polifenol oxidasa, las cuales ayudan a proteger a las plantas del daño ocasionado por las proteasas digestivas de los insectos (Doares *et al.*, 1995).

La mutante *coi1-1* se aisló en una búsqueda ("screening") de mutantes de *A. thaliana* insensibles a la inhibición del crecimiento por la toxina bacteriana coronatina, la cual está relacionada estructuralmente con el ácido jasmónico y el OPDA (Feys *et al.*, 1994). Las mutantes *coi1-1* no responden a la inhibición del

crecimiento de las raíces por el MeJA, son machos estériles y son insensibles al JA, ya que no expresan a genes regulados por dicha hormona, tales como los VSPs, el *Thi2.1* y el *PDF1.2* (Penninckx *et al.*, 1998; Devoto *et al.*, 2002). Además, éstas mutantes *coi1-1* son susceptibles a la herida y a los ataques por insectos herbívoros y por distintos patógenos (McConn *et al.*, 1997; Thomma *et al.*, 1998; Xie *et al.*, 1998). Por lo tanto, éstos resultados muestran la importancia del JA en la respuesta de defensa de la planta a la herida. Además, se ha visto que las LOXs inducidas por la herida también se inducen por la aplicación exógena del JA (Porta *et al.*, 1999), lo cual sugiere un mecanismo de retroalimentación en la biosíntesis del JA y la participación de éste compuesto en la regulación de la síntesis de otras oxilipinas.

El gen *COI1* codifica para una proteína de 67 kDa con 16 repeticiones ricas en leucina (LRRs) y un motivo de caja F en su extremo N-terminal (Xie *et al.*, 1998). Las proteínas con caja F se encuentran presentes en los organismos eucariontes desde la levadura hasta el hombre, y funcionan como receptoras de proteínas reguladoras que después de ser ubiquitinadas son transferidas al proteasoma para su degradación. Las proteínas con caja F se asocian con las proteínas SKP1, culina y Rbx para formar una ligasa de ubiquitina E3 conocida como el complejo SCF (Devoto *et al.*, 2002).

En *A. thaliana* hay al menos 10 proteínas culininas, 19 proteínas similares a SKP1, o ASKs, y 337 proteínas con caja F (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Las proteínas con caja F proporcionan especificidad al complejo E3. Entre las proteínas con caja F de plantas con una función conocida se encuentran TIR1, involucrada en la respuesta a auxina (Ruegger *et al.*, 1998), UFO/FIM, requerida para el desarrollo floral (Ingram *et al.*, 1997), FKF y ZTL, ambas involucradas en el control del ritmo circadiano (Nelson *et al.*, 2000), y COI1, requerida para la respuesta a jasmonatos (Xie *et al.*, 1998).

Los aldehídos- y alcoholes-C6 producidos a partir de la rama de la hidroperóxido liasa (HPL), forman parte del olor asociado con las hojas heridas, por lo cual también se les llama compuestos volátiles de hoja verde (Noordermeer *et al.*, 2001). En *A. thaliana*, el trans-2-hexenal, comúnmente emitido después de una herida, induce la expresión de algunos genes que responden al JA, como el gen AOS, sin embargo, falla en la inducción de otros genes que responden al JA, como el *Thi2.1* que codifica para una tionina con propiedades antimicrobianas (Bate y Rothstein, 1998). Esto indica que señales diferentes de las ramas derivadas de LOX actúan también como mediadoras en la respuesta a la herida.

Por otra parte, se ha demostrado la localización diferencial de las enzimas AOS y HPL dentro de los cloroplastos de tomate. Mientras que la AOS se encontró asociada a la membrana interna, la HPL se encontró asociada a la membrana externa (Froehlich *et al.*, 2001), con lo cual se abre la posibilidad de que distintas LOXs se encuentren también asociadas con diferentes membranas en el cloroplasto, y por ende, con enzimas de diferentes vías, lo que conllevaría a la compartimentalización de la síntesis de las oxilipinas dentro del cloroplasto.

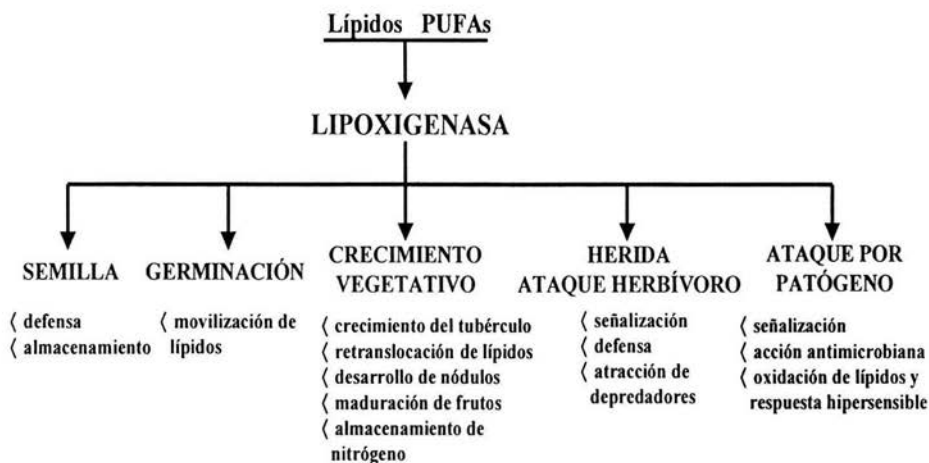


Figura 4. Funciones de las lipoxigenasas durante la vida de la planta (modificada de Porta y Rocha-Sosa, 2002).

TABLA I. Productos del metabolismo de las lipoxigenasas con una actividad propuesta o conocida (modificada de Porta y Rocha-Sosa, 2002).

COMPUESTO	RAMA	ACTIVIDAD
(13S)-Hidroperoxi-(9Z-11E)-octadecadienoico (13-HPOD) y HPOT	-	Inhibidores de la síntesis de micotoxinas ^a
9- y 13-HPOD o HPOT	-	Desarrollo de la respuesta hipersensible ^a
Ácido jasmónico (JA)	Aleno óxido sintasa (AOS)	Señalización en la resistencia a los insectos y a la herida ^a ; inducción de genes de defensa ^a ; viabilidad del polen ^a
OPDA	AOS	Señalización en respuesta a la herida y al ataque por patógeno ^a ; curvamiento de zarcillos ^a
(C6-) volátiles (aldehídos y alcoholes)	Hidroperóxido liasa (HPL)	Señalización en respuesta a la herida ^a ; atrayentes de enemigos de los herbívoros ^a ; antimicrobianos ^a ; olores ^a
Ácido dinor-oxo-fitodienoico	AOS	Señalización en respuesta a la herida ^a
9- y 13-cetodienos	LOX	Señalización en respuesta a la herida y al ataque por patógeno ^b ; inducción de la muerte celular ^b
Traumatina	HPL	Señalización en respuesta a la herida ^a
(Z)-jasmona	AOS	Repelente de herbívoros y atrayente de enemigos de los herbívoros ^a ; señalización en la defensa de la planta ^a
Ácidos colneleico y colnelénico	Divinil eter sintasa (DES)	Antimicóticos ^a

^a Actividad conocida ^b Actividad propuesta

Los compuestos volátiles de hoja verde actúan en la defensa de las plantas contra los insectos directa- o indirectamente. Su implicación directa se demostró en plantas transgénicas de papa sin HPL, las cuales exhibieron menor resistencia a los áfidos (Kessler y Baldwin, 2002). Los compuestos volátiles de hoja verde también juegan un papel como moléculas señal. En un estudio de campo realizado por Kessler y Baldwin (2001) se demostró que el cis-3-hexenol, comúnmente encontrado en el espacio superior de las plantas después de un ataque por herbívoro, atrae a un depredador cuando es liberado por las plantas.

Cuando las plantas son dañadas por insectos herbívoros se incrementa significativamente la cantidad de compuestos volátiles normalmente liberados por una planta intacta. Estos compuestos volátiles son cualitativa- y/o cuantitativamente diferentes de aquellos emitidos por las plantas heridas mecánicamente o sin dañar (Arimura *et al.*, 2000), debido probablemente a los productos que se encuentran en las secreciones orales de los insectos. Uno de éstos productos, la volicitina encontrada en las secreciones orales de la oruga (*Spodoptera exigua*) de la remolacha, induce por sí mismo la liberación de compuestos volátiles que atraen a avispas parásitas (*Cotesia marginiventris*) en las plantas de maíz (*Zea mays*) (Alborn *et al.*, 1997). Debido a que la estructura de la volicitina se relaciona con los productos de la vía de AOS, se sugiere que éste compuesto podría estar involucrado en la activación de las respuestas de defensa de las plantas mediadas por las LOXs.

La aplicación exógena del JA induce la producción de una mezcla de compuestos volátiles por las plantas que es similar, pero no idéntica, a aquella producida en respuesta al ataque por herbívoros (Agrawal, 2000). Además, en un experimento de campo se demostró que la aplicación exógena del JA en plantas de tomate, provoca un aumento en el parasitismo de las larvas de *S. exigua* por su enemigo natural, la avispa *Hyposoter exiguae* (Thaler, 1999). De ésta manera, los productos de la vía de la LOX funcionan en la protección de la planta contra los herbívoros a través de la inducción de varias moléculas de defensa y mediante la atracción de depredadores.

Defensa contra el ataque por patógenos

La infección de plantas de cacahuate con *Aspergillus* spp induce la expresión de la PnLOX1, cuyos productos de reacción, los ácidos 13-HPOD y 9-HPOD, inhiben e inducen la síntesis de micotoxinas, respectivamente, otorgándole a ésta LOX una función en la interacción hongo-planta (Burow *et al.*, 2000). En las plantas de papa infectadas con *Phytophthora infestans* se sintetizan los ácidos colneleico y colnelénico, compuestos con actividad antimicrobiana derivados de la acción de 9-LOXs (Weber *et al.*, 1999); mientras que el compuesto con actividad antimicrobiana producido por las plantas de *Phaseolus vulgaris* en respuesta a la infección con *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* es el trans-2-hexenal derivado de la rama de HPL, el cual inhibe por completo el crecimiento de la bacteria (Croft *et al.*, 1993; Farmer, 1994). El trans-2-hexenal también induce la

acumulación de fitoalexinas sesquiterpenoides en plantas de algodón heridas (Farmer, 2001), actuando de ésta manera en la prevención de infecciones posteriores con microorganismos patogénicos.

Las defensinas son proteínas antifúngicas pequeñas encontradas en los animales y en las plantas (Broekaert *et al.*, 1997). En *A. thaliana*, la expresión local y sistémica del gen de la defensina *PDF1.2* es inducida durante la infección con el hongo necrotrófico *Alternaria brassicicola* (Penninckx *et al.*, 1996). Se ha demostrado que el gen *PDF1.2* se induce en respuesta al JA y que después de la infección con *A. brassicicola*, el JA se acumula tanto en las hojas infectadas como en las hojas sin infectar (Penninckx *et al.*, 1998), implicando al JA en la defensa de la planta contra éste hongo. Sin embargo, aún quedan por confirmar la función directa de la proteína *PDF1.2* y los procesos que regulan la acumulación del JA en respuesta a dicho hongo.

ANTECEDENTES

LA VÍA DE LAS LIPOXIGENASAS EN *Arabidopsis thaliana*

La vía de las LOXs juega un papel muy significativo en la respuesta de defensa inducida de *A. thaliana*, ya que a partir de ésta vía se derivan oxilipinas muy importantes para la planta (Tabla I). Sin embargo, sólo la rama de la vía de las LOXs que parte de la actividad de una 13-LOX sobre el ácido ω -linolénico (18:3) produce a la hormona ácido jasmónico y sus derivados, así como a los hexenales y aldehídos volátiles (Figura 5; Creelman y Rao, 2002), todos compuestos muy importantes para la defensa de la planta. Por tal motivo, ésta rama ha sido la que más se ha estudiado y es la que se describe principalmente a continuación.

Los ácidos grasos octadecatrienoico (ácido α -linolénico, 18:3), hexadecatrienoico (16:3) y monogalactosil diglicérido

El primer paso en la vía de las LOXs comienza con la actividad de éstas sobre los PUFAs que utilizan como sustratos. Las membranas de las plantas, especialmente las membranas de los cloroplastos, son ricas en ácido α -LeA esterificado en los glicerolípidos y en los fosfolípidos (Creelman y Rao, 2002). Los niveles, la distribución y/o la disponibilidad del α -LeA son necesarias para la biosíntesis del JA. Esto se demostró al observar que la mutante de *A. thaliana fad3-2 fad7-2 fad8* con niveles muy bajos de α -LeA es incapaz de acumular JA en respuesta a la herida (McConn *et al.*, 1997). Se ha observado que la herida ocasiona un

incremento en los niveles de los ácidos grasos libres tales como los ácidos LA y α -LeA (Conconi *et al.*, 1996), y que la aplicación de ácido α -LeA en las plantas resulta en la acumulación del JA (Farmer y Ryan, 1992). Lo anterior sugiere que el incremento del JA en las hojas heridas pudiera activar a fosfolipasas, con la consecuente liberación del ácido α -LeA de las membranas.

Las fosfolipasas (PL) se encuentran presentes constitutivamente en los tejidos de las plantas y degradan a las membranas cuando son liberadas de los organelos en respuesta a la herida. En *A. thaliana*, el gen *DAD1* codifica para una fosfolipasa A1 (PLA1) cloroplástica cuya actividad libera a los ácidos grasos de los fosfolípidos. La mutante *dad1* es defectuosa en la dehiscencia de la antera y en la maduración de los granos de polen, pero éstas características se rescatan con la aplicación del ácido α -LeA (Ishiguro *et al.*, 2001). Estos resultados, junto con el hecho de que la acumulación del mRNA de *DAD1* se induce por la herida, indica que la proteína codificada por *DAD1* es una enzima lipolítica que cataliza la liberación del ácido α -LeA, a partir del cual se inicia la biosíntesis del JA. Por otra parte, una construcción en antisentido mostró que la activación de una fosfolipasa D (PLD), la cual hidroliza a los fosfolípidos generando ácido fosfatídico (PA) y grupos de cabeza libres, promueve la producción del JA inducida por la herida (Turner *et al.*, 2002). Además, la activación de la PLD por la herida, resulta de la translocación de ésta enzima desde el citosol hasta las membranas después de que ocurre un incremento en los niveles del Ca^{2+} citosólico inducido por dicho estrés (Wang *et al.*, 2000). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que las LOXs actúen sobre sus sustratos (los PUFAs) cuando éstos se encuentren aún esterificados a los lípidos de las membranas.

Además del ácido α -LeA, se han descubierto otras fuentes de ácidos grasos que podrían participar en la producción del JA. El análisis de la mutante *fad5* deficiente en ácidos grasos hexadecatrienoicos (16:3) mostró que en *A. thaliana*, la molécula de 16 carbonos identificada como ácido dinor-oxo-fitodienoico (dnOPDA) deriva directamente de los hexadecatrienoicos (16:3) de los plástidos y no del proceso de β -oxidación del OPDA. Además, los niveles del dnOPDA aumentan en las hojas heridas (Weber *et al.*, 1997), lo cual indicaría que es liberado de las membranas de los plástidos. Sin embargo, se desconoce si la acción de alguna OPR pudiera introducir al dnOPDA en la vía de síntesis del JA.

Por otra parte, se ha demostrado que el OPDA se libera de los extractos de lípidos de hojas de *A. thaliana* mediante la acción de lipasas específicas *sn1*. La estructura que contiene al OPDA se identificó como *sn1*-O-(12-oxofitodienoil)-*sn2*-O-(hexadecatrienoil)-monogalactosil diglicerido (MGDG-O) y se ha observado un incremento temporal de éste compuesto en las hojas heridas. Además, en *A. thaliana*, más del 90% del OPDA se encuentra esterificado en la posición *sn1* del glicerolípido específico de plástidos monogalactosil diglicérido (Stelmach *et al.*, 2001). De acuerdo con éstos resultados, el OPDA podría actuar como una señal primaria en la respuesta de defensa inducida de la planta y además podría explicar el rápido aumento del JA en respuesta a la herida.

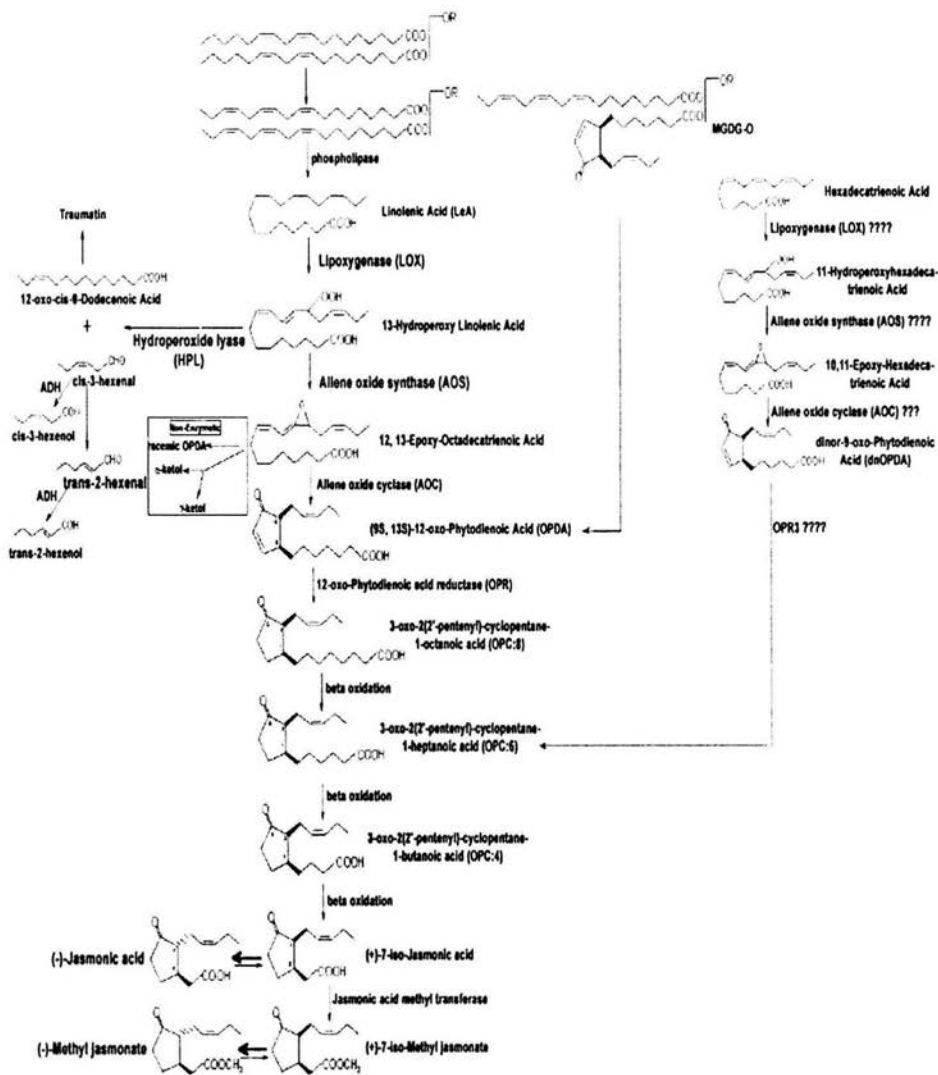


Figura 5. La vía de las lipoxigenasas en *Arabidopsis thaliana*. Se postula que las señales extracelulares interactúan con un receptor en la membrana causando la producción eventual del ácido 13-hidroperoxilinolénico. Se cree que la producción de éste ácido ocurre como resultado de la liberación del ácido α -linolénico mediante la acción de una lipasa o fosfolipasa y su consecuente oxidación por una LOX. Sin embargo, no se descarta la oxidación preliminar del ácido linolénico mientras se encuentra aún esterificado a un fosfolípido y su consecuente liberación por una lipasa. El ácido 13-hidroperoxilinolénico puede entonces ser catabolizado por la hidroperóxido liasa (HPL), formando eventualmente aldehídos y ácido traumático. El ácido jasmónico (JA) se produce a partir del ácido 13-hidroperoxilinolénico mediante la acción de la aleno óxido sintasa (AOS) y la aleno óxido ciclasa (AOC), formando al ácido 12-oxofitodienoico (OPDA) como intermediario. Una vez formado, el ácido jasmónico regula la expresión de genes o se cataboliza (Creelman v Rao. 2002).

Lipoxigenasas

En el genoma de *A. thaliana* se identificaron seis genes que codifican para lipoxigenasas mediante la comparación de nucleótidos con la secuencia del gen *AtLOX2* usando la función FASTA de The Arabidopsis Information Resource (TAIR; <http://www.arabidopsis.org/cgi-bin/fasta/nph-TAIRfasta.pl>). Los genes *AtLOX1* y *AtLOX5* codifican para LOXs con un peso molecular de aproximadamente 98 kDa, las cuales no presentan péptido de tránsito alguno (análisis realizado con el programa ChloroP, <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) lo cual sugiere que se encuentran en el citoplasma. Sin embargo, los genes *AtLOX2*, *AtLOX3*, *AtLOX4* y *AtLOX6* codifican para LOXs que presentan un péptido de tránsito hacia el cloroplasto en su extremo N-terminal (análisis realizado con el programa ChloroP, <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>), las cuales tienen un peso molecular entre los 101 y 104 kDa.

Los genes *AtLOX1* y *AtLOX2* se han aislado y caracterizado. El mRNA de *AtLOX1* se expresa en las hojas, en las raíces, en las inflorescencias y en las plántulas jóvenes, y su acumulación se induce por el ácido abscísico (ABA), el JA y por infección con la bacteria *Pseudomonas syringae* (Melan *et al.*, 1993). Por su parte, el gen *AtLOX2* se expresa principalmente en las inflorescencias y en las hojas, y la acumulación de su mRNA se induce por la herida, el salicilato, el ABA, el MeJA (Bell y Mullet, 1993) y el trans-2-hexenal (Bate y Rothstein, 1998). El papel fisiológico de *AtLOX2* se analizó en plantas transgénicas con cosupresión del gen *AtLOX2*, las cuales muestran un fenotipo similar a las plantas silvestres, sin embargo, no acumulan JA en respuesta a la herida (Bell *et al.*, 1995). Por lo tanto, se requiere de *AtLOX2* para la síntesis del JA inducida por la herida. En cuanto a *AtLOX3*, se ha visto su inducción por el oomicete virulento *Peronospora parasitica* (Mahalingam *et al.*, 2003). También se ha reportado que el gen *AtLOX4* se induce por sequía y NaCl (Seki *et al.*, 2002). Hasta el momento, se desconocen las circunstancias bajo las cuales se expresan los genes *AtLOX5* y *AtLOX6*.

Hidroperóxido liasa

La enzima hidroperóxido liasa (HPL) es una citocromo P450 miembro de la subfamilia CYP74B. Ésta enzima corta los hidroperóxidos formados por la reacción de la lipoxigenasa para producir un aldehído de 6 carbonos (C6) y un oxo-ácido de 12 carbonos (C12) (Chapple, 1998; Noordermeer *et al.*, 2001).

En *A. thaliana* se ha caracterizado un gen que codifica para una HPL con un peso molecular de 54 kDa, la cual presenta un péptido de tránsito hacia el cloroplasto en su extremo N-terminal (Bate *et al.*, 1998). Mediante experimentos de transporte *in vitro* se localizó a la HPL de tomate dentro de la membrana externa del cloroplasto (Froehlich *et al.*, 2001). En *A. thaliana*, el gen *HPL* se expresa principalmente en las inflorescencias, en las yemas florales, en las flores y en las silicuas, y a niveles más bajos en las raíces, en las hojas caulinas y en las

hojas de la roseta. Además, la herida y el MeJA inducen la expresión de HPL en las hojas de la roseta (Bate *et al.*, 1998; Matsui *et al.*, 1999). Significativamente, se ha mostrado una actividad preferencial de la enzima HPL 10 veces mayor por los hidroperóxidos derivados del ácido α -LeA, respecto de aquellos derivados del ácido LA (Bate *et al.*, 1998). Por lo tanto, lo anterior indica que otra isozima de HPL debe existir para catalizar la formación del n-hexanal a partir del 13-hidroperoxilinooleato.

Aleno óxido sintasa

La enzima aleno óxido sintasa (AOS) cataliza la deshidratación del 13(S)-hidroperóxido derivado del ácido α -LeA para producir un epóxido inestable (Turner *et al.*, 2002). El aleno óxido inestable se puede hidrolizar espontáneamente formando una mezcla de α - y γ -cetoles (80% y 10%, respectivamente) y ácido cis-12-oxofitodienoico racémico (OPDA, 10%) o, en una acción concertada con la aleno óxido ciclasa (AOC), se puede ciclar para obtener *cis*(+)-OPDA, el sustrato para la biosíntesis del JA (Schaller, 2001). Al igual que HPL, AOS es una citocromo P450, pero pertenece a la subfamilia CYP74A (Creelman y Rao, 2002).

En el genoma de *A. thaliana* existe un solo gen que codifica para la enzima AOS, la cual presenta un péptido de tránsito hacia el cloroplasto en su extremo N-terminal y tiene un peso molecular de 58 kDa (Laudert *et al.*, 1996). La localización de AOS dentro del cloroplasto se ha determinado sólo en el tomate mediante ensayos de transporte *in vitro*, encontrando a ésta enzima en las fracciones de membrana interna (Froehlich *et al.*, 2001). En *A. thaliana*, el gen AOS se expresa principalmente en las hojas y en las flores, y se induce por el JA, por la herida, por el OPDA, por el ácido salicílico (SA) (Kubigsteltig *et al.*, 1999) y por el trans-2-hexenal (Bate y Rothstein, 1998). Además, se ha observado que la herida también ocasiona un incremento en la actividad de AOS tanto en el tejido dañado como sistémicamente en otros órganos de la planta (Laudert y Weiler, 1998).

La planta mutante "knock-out" de AOS en *A. thaliana* es macho estéril y defectuosa en la transducción de señales en respuesta a la herida, debido al bloqueo en la biosíntesis del JA (Park *et al.*, 2002). La sobreexpresión de AOS en plantas transgénicas de tabaco y de *A. thaliana* no altera el nivel basal del JA en las hojas sin herir, pero cuando éstas plantas transgénicas se hieren, producen niveles más altos de JA respecto de las plantas silvestres heridas (Laudert *et al.*, 2000). Éste resultado sugiere que la ruta biosintética del JA está limitada por la producción del ácido linolénico o del ácido 13-hidroperóxilinoilénico.

Aleno óxido ciclasa

La enzima aleno óxido ciclasa (AOC) cataliza la ciclización estereoespecífica del aleno óxido inestable para formar al ácido (9S,13S)-12 oxo-(10,15Z)-fitodienoico (OPDA) (Turner *et al.*, 2002).

Basándose en la homología entre las secuencias, Stenzel *et al.* (2003) aislaron cuatro cDNAs de *A. thaliana* a partir de la AOC de tomate, las cuales codifican para proteínas con pesos moleculares de 28 kDa que presentan actividad de AOC. Los cuatro genes AOC de *A. thaliana* responden a la herida tanto local como sistémicamente, siendo el gen AOC2 el mayormente expresado. El transcrito de AOC2 también se acumula en respuesta al MeJA. En contraste, la proteína AOC se encontró presente constitutivamente, y mediante un análisis inmunológico se localizó en las hojas de la roseta, en las hojas caulinas, en los haces vasculares y en las yemas florales.

12-oxo-fitodienoato reductasa

La enzima 12-oxo-fitodienoato reductasa (OPR) cataliza la reducción del OPDA al ácido 3-oxo-2(2'-pentenil)-ciclopentano-1-octanoico (OPC:8) (Schaller, 2001). Se han identificado tres isozimas de OPR en *A. thaliana* con una masa molecular de 54 kDa. Los genes *OPR1* y *OPR2* codifican para proteínas con poca habilidad para reducir el isómero natural (9S, 13S) del OPDA a OPC:8, mientras que la *OPR3* cataliza eficientemente ésta reacción. Por lo tanto, *OPR3* codifica para la proteína involucrada en la biosíntesis del JA. *OPR1* y *OPR2* se expresan predominantemente en las raíces y son inducidos por la herida. En cambio, *OPR3* se expresa en toda la planta, incluyendo flores y hojas, y su expresión se induce por la herida, por el JA y por la irradiación UV. Además, la *OPR3* contiene un péptido SRL en su extremo C-terminal que sugiere que ésta enzima se encuentra en el peroxisoma (Creelman y Rao, 2002), lo cual implicaría que su sustrato, el OPDA, debe ser transportado desde el cloroplasto hasta el peroxisoma.

El análisis de la mutante *opr3* ha arrojado resultados muy interesantes respecto al papel del OPDA en la respuesta de defensa de las plantas. Dicha mutante es deficiente en la biosíntesis del JA y acumula OPDA cuando es herida. Significativamente, la mutante *opr3* tiene respuestas de defensa relacionadas con el JA para combatir el ataque de insectos (Turner *et al.*, 2002). Por lo tanto, aunque la aplicación tópica del JA y del MeJA induzca la transcripción de genes de defensa en *A. thaliana*, el OPDA por sí mismo es suficiente para activar las respuestas de defensa de la planta.

β -oxidación

La vía de β -oxidación contiene enzimas que degradan a los ácidos grasos mediante la remoción secuencial de dos unidades de carbono (Creelman y Rao, 2002). A través de ésta vía, el OPC:8 se somete a tres pasos de β -oxidación para formar al JA (Turner *et al.*, 2002). Esto probablemente sucede en los peroxisomas y/o glioxisomas, puesto que éstos son los únicos sitios donde se sabe que ocurre la β -oxidación en plantas (Schaller, 2001). Sin embargo, se ha realizado muy poca investigación sobre ésta vía en *A. thaliana*, de la cual sólo se han identificado tres 3-ceto-acil tiolasas (Creelman y Rao, 2002).

Metiltransferasa del ácido jasmónico

La metilación del JA para producir al MeJA es catalizada por una S-adenosil-L-metionina:carboxil metiltransferasa del ácido jasmónico (JMT) en *A. thaliana* (Turner *et al.*, 2002). El gen *JMT* codifica para un péptido putativo de 45 kDa que aparentemente no tiene péptido de tránsito, lo cual indica que JMT es presumiblemente una enzima citoplásmica. El mRNA del gen *JMT* se expresa en el tejido vegetativo y en las flores en desarrollo, y se acumula local y sistémicamente cuando los tejidos son heridos o tratados con MeJA (Seo *et al.*, 2001).

Las plantas transgénicas de *A. thaliana* que sobreexpresan a la *JMT* acumulan MeJA sin alterar el contenido del JA, expresan constitutivamente a los genes *VSP* y *PDF1.2*, los cuales responden al JA, y son más resistentes a la infección por *Botrytis cinerea* (Seo *et al.*, 2001). Esto sugiere que la expresión de la *JMT* es suficiente para inducir algunas respuestas dependientes del JA, y que el MeJA puede funcionar como una molécula señal endógena en la respuesta de defensa de las plantas.

JUSTIFICACIÓN

De los cuatro genes (*AtLOX2*, *AtLOX3*, *AtLOX4* y *AtLOX6*) que codifican para LOXs de *A. thaliana* que presentan un péptido de tránsito hacia el cloroplasto, sólo se ha caracterizado a *AtLOX2*, el cual responde a la herida. Por lo tanto, el estudio de la expresión de los demás genes en respuesta a la herida, permitiría elucidar si dichas LOXs participan también en la respuesta de defensa de *A. thaliana* a dicho estrés.

El análisis de la expresión de los genes *AtLOX2*, *AtLOX3*, *AtLOX4* y *AtLOX6* en las plantas transgénicas con cosupresión de *AtLOX2* (incapaces de acumular JA en respuesta a la herida) y en las plantas mutantes *coi1-1* (insensibles al JA) heridas determinaría si el JA producido endógenamente en la planta en respuesta a la herida afecta la expresión de estos genes.

El análisis de la expresión de los genes *AOS* y *HPL* en las plantas silvestres, cosupresoras de *AtLOX2* y mutantes *coi1-1* heridas, determinaría si el JA inducido por la herida regula la expresión de éstos genes. Además, el análisis de la expresión de éstos genes junto con los de las LOXs permitiría saber más acerca de los procesos que regulan a las distintas ramas de síntesis de oxilipinas que parten de los productos derivados de las reacciones de las LOXs.

Aunado a lo anterior, la exposición de las plantas a los compuestos volátiles MeJA y trans-2-hexenal derivados de las ramas de la AOS y de la HPL, respectivamente, ayudaría a comprender mejor los procesos de autorregulación de estas dos ramas.

Por otra parte, debido a que el hongo necrotrófico *A. brassicicola* induce un incremento en los niveles endógenos de JA en las plantas silvestres de *A. thaliana* infectadas con este hongo, el estudio de la expresión de los genes mencionados anteriormente mostraría si existe una correlación entre el aumento del JA y la expresión de los genes, sobre todo de *AtLOX2* y *AOS*, los cuales participan en la biosíntesis de dicho compuesto.

El análisis de la acumulación de las proteínas LOX y AOS en las plantas heridas revelaría posibles eventos post-transcripcionales o post-traduccionales inducidos por dicho estrés. Para realizar éste análisis se utilizarían dos anticuerpos con los que se cuenta en el laboratorio: anti-LOXH1 y anti-StAOS de *Solanum tuberosum*.

La inmunolocalización de las proteínas detectadas por los anticuerpos anti-LOXH1 y anti-StAOS de *S. tuberosum* en extractos de cloroplastos mostraría que los péptidos de tránsito de estas proteínas son funcionales.

HIPÓTESIS

“Los genes de las cuatro lipoxigenasas de *Arabidopsis thaliana* que presentan un péptido de tránsito hacia el cloroplasto y los genes *AOS* y *HPL* se van a expresar de manera diferencial dependiendo del estrés al cual se somete a la planta”.

OBJETIVOS

GENERAL:

Estudiar la expresión de los genes *AtLOX2*, *AtLOX3*, *AtLOX4*, *AtLOX6*, *AOS* y *HPL* de la vía de las lipoxigenasas como parte de la respuesta de defensa de *Arabidopsis thaliana* inducida por la herida mecánica y por el hongo *Alternaria brassicicola*.

PARTICULARES:

- 1.- Diseñar oligonucleótidos que amplifiquen específicamente a los genes *AtLOX2*, *AtLOX3*, *AtLOX4*, *AtLOX6*, *AOS* y *HPL*.
- 2.- Analizar la acumulación del mRNA de los genes *AtLOX2*, *AtLOX3*, *AtLOX4*, *AtLOX6*, *AOS* y *HPL* en respuesta a la herida mecánica en tres tipos de plantas: silvestres, transgénicas con cosupresión de *AtLOX2* y mutantes *coi1-1*.
- 3.- Analizar la acumulación del mRNA de los genes *AtLOX2*, *AtLOX3*, *AtLOX4*, *AtLOX6*, *AOS* y *HPL* en plantas silvestres expuestas a los compuestos volátiles metil jasmonato y trans-2-hexenal, e infectadas con el hongo necrotrófico *Alternaria brassicicola*.
- 4.- Analizar la acumulación de las proteínas LOX y AOS en respuesta a la herida mecánica en tres tipos de plantas: silvestres, transgénicas con cosupresión de *AtLOX2* y mutantes *coi1-1*.
- 5.- Analizar la acumulación de las proteínas LOX y AOS en los cloroplastos de plantas silvestres heridas.

MATERIALES Y MÉTODOS

PLANTAS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Se usó como modelo de estudio a la planta *Arabidopsis thaliana*. Se trabajó con el ecotipo Columbia y se utilizaron plantas silvestres, plantas transgénicas con cosupresión de *AtLOX2* y plantas mutantes *coi1-1*. Las semillas se obtuvieron del stock de semillas de The Arabidopsis Information Resource (TAIR, www.arabidopsis.org).

Esterilización de las semillas

Se imbibieron las semillas en agua destilada (sistema de purificación Modulab PureOne) por 30 min. Después, se lavaron con etanol (Merck, México) al 70% (v/v) por 1 min. Se dejaron en una solución de clorox o cloralex al 50% (v/v) por 8 min y por último, se lavaron 4 o 5 veces con agua destilada estéril. Para almacenar las semillas, se secaron a temperatura ambiente y se guardaron a 4° C. La esterilización de soluciones y medios de crecimiento se realizó en autoclave (Tommy, USA) a 15 lb/pulg² (120° C) por 20 min.

Sembrado y condiciones de crecimiento

Se incubaron las semillas a 4° C durante toda la noche. Después, se imbibieron en agua destilada estéril y se sembraron por goteo en medio de crecimiento Metro-Mix 200 (Scotts, OH, USA) estéril (humedecido previamente con agua destilada estéril) contenido en macetas de plástico cuadradas de 3" X 3" X 2.5" (Hummert de México). Las semillas sembradas fueron cubiertas con un domo transparente por 5 días hasta que emergieron las plántulas. Se regó alternadamente con solución nutritiva (MnSO₄ 1mM; H₃BO₃ 2mM; ZnSO₄·7H₂O 0.5mM; CuSO₄·5H₂O 0.2mM; CoCl₂·6H₂O 0.1mM; Na₂MoO₄·2H₂O 0.1mM; CaCl₂ 100mM; KH₂PO₄ 50mM; EDTA 6mM; FeSO₄ 9mM; MgSO₄ 50mM; K₂SO₄ 25mM; KNO₃ 10mM; (NH₄)₂SO₄ 2mM (Sigma, México)) al 25% y con agua destilada estéril cada tres días. Las plantas fueron crecidas en un cuarto de crecimiento con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a una temperatura de 25° C ± 1° C.

Selección de las plantas mutantes *coi1-1*

El procedimiento de selección se realizó bajo condiciones estériles en la campana de flujo laminar horizontal (Veco, México). Se sembraron las semillas de plantas silvestres y mutantes *coi1-1* en cajas de petri con medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 4.3 g de sales/L) enriquecido con vitaminas B5 (1ml/L), sacarosa 2%

(w/v) y phytagar 0.8% (w/v) esterilizado, adicionado con 100 μ M de MeJA disuelto en N,N-dimetilformamida, y se dejaron crecer las plántulas en el cuarto de crecimiento por 7 días. Las plántulas cuyo crecimiento de raíces no se inhibió por la presencia del MeJA, en comparación con las plántulas silvestres, se identificaron como mutantes *coi1-1*. Una vez comprobadas e identificadas, se pasaron las plántulas mutantes *coi1-1* a medio de crecimiento Metro-Mix 200 (Scotts, OH, USA) y se dejaron crecer en el cuarto de crecimiento.

OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos usados en los ensayos de RT-PCR y PCR se diseñaron sobre las regiones con menor identidad (extremos 5' y 3') entre las secuencias de nucleótidos de las cuatro LOXs de *A. thaliana* con péptido de tránsito hacia el cloroplasto. Dichos oligonucleótidos se describen en la Figura 6, junto con los oligonucleótidos diseñados para amplificar a los genes AOS, HPL y APT1.

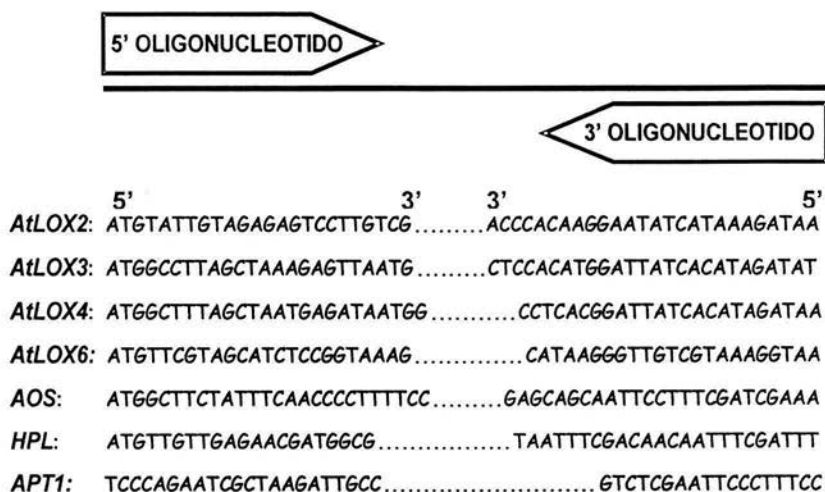


Figura 6. Oligonucleótidos usados.

Los oligonucleótidos se sintetizaron en la unidad de síntesis de oligonucleótidos del Instituto de Biotecnología de la UNAM por el método de fosfito-triester (Sintetizador Automatizado 391 de Applied Biosystems).

EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

La extracción de DNA genómico se realizó siguiendo un protocolo descrito por Saghai-Marooif *et al.* (1984). Se homogenizaron 300 mg de hojas de la roseta de *A. thaliana* en 5 o 7 ml de buffer CTAB 2X contenidos en tubos de PPCO redondos para centrifuga de 50 ml durante aproximadamente 15 segundos con la ayuda de un Polytron PT 10-3S (Kinematica). Se incubó el homogenizado a 65° C durante 20 min. Se centrifugó a 3000xg por 10 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo de polipropileno de fondo redondo de 14 ml (Falcon) para ser extraído con una solución 24:1 de cloroformo/alcohol isoamílico mediante agitación suave con vórtex (Scientific Industries) seguida de una centrifugación a 12,000xg por 15 min. Al sobrenadante extraído se le agregó 0.7 de volumen de isopropanol; se incubó en hielo por 5 min y se centrifugó a 800xg por 10 min. La pastilla formada se disolvió en 400 µl de CsCL 1M y se transfirió a un tubo de microcentrifuga (Eppendorf) donde se le adicionaron 800 µl de etanol al 96% (v/v). Se centrifugó a 7000xg por 10 min. La pastilla formada se lavó con 3 volúmenes de etanol al 70% (v/v); se disolvió en 250 µl de TE con RNasa (20 µg/ml) y se incubó a 37° C por 15 min. Se adicionaron 60 µl de NaCl 5M y se extrajo el sobrenadante con una solución 50:49:1 de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. El sobrenadante extraído se precipitó con 3 volúmenes de etanol al 96% (v/v) durante toda la noche a -20° C. Se centrifugó a 10,000xg por 15 min. La pastilla formada se lavó con etanol al 70%; se dejó secar y se disolvió en 250 µl de buffer TE.

CUANTIFICACIÓN DE DNA Y RNA

La cuantificación de DNA y RNA se hizo espectrofotométricamente mediante la medición de la cantidad de irradiación ultravioleta absorbida por las bases (Sambrook *et al.*, 1989). Se hicieron diluciones de las muestras de DNA y de RNA en agua destilada estéril y se colocaron en el espectrofotómetro (Beckman Du 650, México) usando celdas de cuarzo. Se midió la densidad óptica (DO) de las muestras a una longitud de onda de 260 nanómetros (nm) y se calculó la concentración de los ácidos nucleicos tomando en cuenta que una DO₂₆₀ de 1 corresponde aproximadamente a 50 µg/ml para DNA de doble hebra y a 40 µg/ml para DNA y RNA de una sola hebra.

REACCIÓN EN CADENA DE LA DNA POLIMERASA (PCR)

Para las PCRs se utilizó un termociclador GeneAmp 9700 de Applied Biosystems. Para una reacción de 50 µl se mezcló lo siguiente: 5 µl de buffer para PCR 10X, 1.5 µl de MgCl₂ 50 mM, 1 µl de dNTP's 10 mM, 1 µl del oligonucleótido 5' a 10 pmol/µl, 1 µl del oligonucleótido 3' a 10 pmol/µl, 0.5 µl de *Taq* DNA polimerasa (2.5 unidades/reacción) (Roche, México), 2 µl de cDNA y 38 µl de agua destilada

estéril. Para la PCR a partir de DNA genómico se utilizaron 3 μ l de los oligonucleotidos 5' y 3', 1.5 μ l del sistema (mezcla de las enzimas *Taq* DNA y *Pwo* DNA polimerasas) para expandir la PCR con alta fidelidad (5.2 unidades por reacción) (Roche, México) y 1.6 μ g de DNA genómico. Las condiciones en las que se llevaron a cabo las reacciones se describen a continuación.

AMPLIFICACIÓN A PARTIR DE DNA GENÓMICO:

Desnaturalización	Hibridación	Extensión	Ciclos
Primer paso 3 min a 94° C			1
Segundo paso 30 seg a 94° C	30 seg a 65° C (AOS); a 56° C (HPL); a 59° C (<i>AtLOX2</i> y <i>AtLOX4</i>); a 58° C (<i>AtLOX3</i> y <i>AtLOX6</i>)	6 min a 68° C	10
Tercer paso 30 seg a 94° C	30 seg a la temperatura descrita para cada gen	6 min a 68° C	20
Cuarto paso		5 min a 72° C	1

AMPLIFICACIÓN A PARTIR DE cDNA:

Desnaturalización	Hibridación	Extensión	Ciclos
Primer paso 3 min a 94° C			1
Segundo paso 30 seg a 94° C 1min (<i>APT1</i>)	30 seg a la temperatura descrita para cada gen; 1 min a 55° C (<i>APT1</i>)	2 min 30 seg (<i>AtLOX2</i> , <i>AtLOX3</i> , <i>AtLOX4</i> y <i>AtLOX6</i>); 1 min 30 seg (AOS y <i>HPL</i>); 1 min (<i>APT1</i>) a 72° C	35; 25 (AOS)
Tercer paso		5 min a 72° C	1

Los productos amplificados se corrieron en geles de agarosa al 1% (w/v) en buffer TAE 1X. Se tiñó el gel con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y se detectaron los fragmentos con luz ultravioleta (Fotodyne).

ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN CON NUCLEASAS

Los productos genómicos amplificados mediante PCR de cada uno de los genes se digirieron con endonucleasas de restricción. Para dichas digestiones se mezcló lo siguiente: 1 µl de enzima (*Xho* I, 20,000 U/ml; *Sac* I, 20,000 U/ml; *Nco* I, 10,000 U/ml; *EcoR* I, 20,000 U/ml y *EcoR* V, 20,000 U/ml (BioLabs)), 2 µl de buffer de reacción, entre 0.5 µg y 1 µg de DNA (productos genómicos de AOS, *HPL*, *AtLOX2*, *AtLOX3*, *AtLOX4* y *AtLOX6*) y agua destilada estéril hasta completar 20 µl. Se incubaron las digestiones durante toda la noche a 37° C. Se detectaron los fragmentos cortados en geles de agarosa como se describe anteriormente.

TRATAMIENTOS APLICADOS A LAS PLANTAS.

Herida mecánica

Se hirieron las hojas de la roseta de plantas de *A. thaliana* de 4 semanas de edad presionándolas con pinzas.

Metil jasmonato, trans-2-hexenal y etanol

La exposición de las plantas a los compuestos MeJA y trans-2-hexenal se hizo mediante la volatilización de éstos, siguiendo un protocolo modificado del descrito por Bate y Rothstein (1998). Se pusieron las plantas silvestres de *A. thaliana* de 4 semanas de edad en cámaras individuales (una para cada tiempo de inducción) con un volumen de 8.3 dm³ cada una. Se adaptaron las plantas incubándolas por 24 horas en el cuarto de crecimiento bajo las condiciones descritas. Después se colocó en cada cámara un cotonete impregnado con 83 µl de MeJA ó trans-2-hexenal 0.1M disuelto en etanol (Merck, México) para tener una concentración final en cada cámara de 10µM de cada uno de los compuestos volátiles. Las plantas control se trataron sólo con etanol. Después de 0, 0.5, 1, 2, 4 y 24 horas de exposición a los compuestos volátiles MeJA, trans-2-hexenal y etanol, se sacaron las plantas de cada una de las cámaras y se prosiguió con la extracción del RNA total.

Alternaria brassicicola

La inoculación de las plantas con el hongo necrotrófico *Alternaria brassicicola* se realizó siguiendo un protocolo modificado del descrito por Penninckx *et al.* (1996). Se cultivó al hongo en agar con dextrosa de papa 0.5X a 22° C con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad por 9 días. Subsecuentemente se lavaron las esporas de la superficie del medio sólido con agua destilada estéril. Se determinó la concentración de esporas usando un hemacitómetro y se ajustó a 5×10^5 esporas conidiales ml^{-1} . Las plantas de *A. thaliana* de 4 semanas de edad fueron inoculadas mediante la aspersión de las esporas conidiales sobre las hojas de la roseta. Las plantas control se trataron sólo con agua. El RNA total se extrajo de las hojas de la roseta después de 0, 12, 24, 48 y 72 horas de inoculación.

EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

El RNA se extrajo siguiendo el protocolo descrito por Chirgwin *et al.* (1979). Se molió 1 g de tejido (hojas de la roseta) congelado, en 3 ml de buffer de extracción (Tris-HCl pH 8.0 2M, EDTA pH 8.0 0.5M, SDS 20% (w/v) en una relación 1:2:1) con un Polytron PT 10-3S (USA). Se centrifugó a 4000xg en un rotor JA-20 por 10 min a 20° C. Se colectó el sobrenadante en tubos Corex de 30 ml y se le adicionó un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (50:49:1). Se agitó con vórtex y se centrifugó a 4000xg por 5 min a 20° C. Se extrajo el sobrenadante dos veces con un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (49:1); se agitó con vórtex y se centrifugó a 4000xg por 5 min a 20° C. Se colectó el sobrenadante; se le agregó un volumen de LiCl 8M y se dejó precipitar durante toda la noche a 4° C. La solución con el precipitado se centrifugó a 4000xg por 15 min a 20° C y se resuspendió la pastilla con 200 μl de agua destilada estéril pasándola a un tubo de microcentrifuga (Eppendorff). Se le agregó 1/10 de volumen de acetato de sodio (Na_2Ac) 3M pH 5.5 seguido de 3 volúmenes de etanol al 96% y se precipitó durante toda la noche a -20° C. Se centrifugó a 14,000xg por 15 min a 4° C. Se secó la pastilla a temperatura ambiente y se lavó con 200 μl de etanol al 70%. Finalmente se resuspendió la pastilla en 20 μl de agua destilada estéril.

TRANSCRIPCIÓN REVERSA MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA DNA POLIMERASA (RT-PCR)

La RT-PCR se hizo en un termociclador GeneAmp 9700 de Applied Biosystems como se describe a continuación. Se mezcló 1 μl de oligo dT (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 2 μg de RNA total y agua destilada estéril hasta completar un volumen de 12 μl . Se calentó la mezcla a 70° C por 10 min y se enfrió en hielo. Se colectó por centrifugación breve (spin) y se agregaron 4 μl de buffer de la primera hebra 5X, 2 μl de DTT 0.1 M y 1 μl de dNTPs 10 mM. Se mezcló y se incubó a 42° C por 2 min. Se agregó 1

μl (200 U) de transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen, México), y se incubó por 50 min a 37° C. Se inactivó la reacción a 70° C por 15 min obteniéndose cDNA como producto final.

TRANSFERENCIA DE RNA DESDE GELES A MEMBRANAS DE NYLON (NORTHERN BLOT)

Se incubó el RNA a 55° C por 15 min para desnaturalizarlo. Se cargaron 10 μg de RNA total disuelto en buffer de carga (1:3) (ver apéndice) en un gel de agarosa al 1.2% (w/v) con formaldehído (4% v/v) y MOPS 10X (10% v/v) y se corrió a 80 volts por 1 hora en buffer MOPS 1X. Se verificó la integridad y la carga homogénea del RNA en el gel con luz ultravioleta. Se incubó el gel en 500 ml de SSC 10X por 20 min para eliminar el formaldehído. Se transfirió el RNA desde el gel a la membrana de nylon Hybond N+ (Amersham) por capilaridad durante 8-16 horas mediante una corriente de SSC 10X que se estableció desde un recipiente inferior pasando por el gel y la membrana hasta filtros secos por encima de todo. Se comprobó la transferencia del RNA observando al ultravioleta el gel y la membrana de nylon. Se lavó la membrana de nylon con SSC 1X para quitar los restos de agarosa y sal.

Una vez transferido, el RNA se fijó a la membrana con NaOH y luz ultravioleta. Para fijar con NaOH se incubó la membrana con NaOH 0.05 M por 5 min. Se lavó tres veces con SSC 3X y se incubó en el último lavado por 5 min. Para fijar con luz ultravioleta se utilizó el UV Stratalink (Stratagene) dando dos pulsos de "auto cross-link" que determinan una dosis óptima de 0.12 julios de luz de 254 nm cada uno. Se secaron las membranas a temperatura ambiente y se guardaron entre papel de cromatografía (Whatman) dentro de una bolsa de plástico a 4° C.

MARCAJE DE SONDA E HIBRIDACIÓN A RNA FIJADO A MEMBRANA

Las sondas se marcaron radioactivamente con [³²P] usando un sistema de marcaje de DNA Megaprime (Amersham, México). Se mezclaron 25 ng del DNA templado con 5 μl de primers y agua destilada estéril para tener un volumen de reacción de 50 μl . Se desnaturalizó a 100° C por 5 min en un baño de agua hirviendo. Se agregaron 10 μl de buffer de marcaje, 5 μl de dCTP y 2 μl de la enzima DNA polimerasa (Klenow, 1 U/ μl), y se incubó a 37° C por 30 min. Se paró la reacción con 5 μl de EDTA 0.2 M. La proporción de radionucleótido incorporado se determinó mediante el conteo de Cerenkov (Brown, 1991) como se describe a continuación. Se aplicó 1 μl de la reacción en dos fragmentos (T: total e I: incorporado) de papel para cromatografía (Whatman DE81). El fragmento I se lavó tres veces con fosfato sódico 0.5 M pH 7.2 por 10 min. Ambos fragmentos (T e I)

se colocaron en viales con agua destilada y se midió la incorporación en un contador LS Analyzer (Beckman).

Las membranas con el RNA fijado se prehibridaron a 65° C por un mínimo de 2 horas en tubos de vidrio con 10 ml de buffer de prehibridación. Se desechó el buffer de prehibridación y se agregó buffer PSE precalentado (10 µl). Se desnaturalizó la sonda marcada a 100° C por 5 min y se agregó al tubo de hibridación. Se hibridó durante toda la noche a 65° C. Por ser híbridos homólogos los que se formaron, las membranas se lavaron dos veces a 65° C por 10 min con SSC 0.4X y SDS 0.1% (w/v) caliente. Los híbridos radioactivos se detectaron mediante autoradiografía usando films Kodak X-OMAT.

La sonda radioactiva se eliminó de las membranas (las cuales no se dejaron secar) con una solución hirviendo de SDS al 0.1% (w/v). Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se guardaron las membranas como se describe en el apartado de Northern blot.

EXTRACCIÓN DE PROTEINAS TOTALES

Se pulverizó el tejido congelado en nitrógeno líquido con la ayuda de mortero y pistilo. Se colectó el tejido pulverizado en tubos de microcentrifuga y se le agregó 1/3 volumen de buffer Laemmli 2X. Inmediatamente se desnaturalizaron las proteínas a 100° C por 10 min en un baño de agua hirviendo. Se centrifugó brevemente (spin); se colectó el sobrenadante y se guardó a -20° C.

EXTRACCIÓN DE CLOROPLASTOS

La extracción de cloroplastos se realizó de acuerdo con lo descrito por Joyard y Douce (1979). Para evitar la acumulación de gránulos de almidón que pudieran romper a los cloroplastos durante el procedimiento de extracción, se dejaron las plantas en oscuridad durante toda la noche antes de ser utilizadas.

El procedimiento de extracción se realizó a 5° C y todas las soluciones y medios usados se enfriaron previamente. Para obtener una cantidad de cloroplastos considerable se utilizó la mayor cantidad posible de hojas de la roseta de *A. thaliana* (aprox. 50 gramos). Se homogenizaron las hojas en medio de aislamiento (sacarosa 330mM, tricina 30mM pH 7.8, EDTA 2mM pH 8.0 y albúmina sérica bovina 0.1% (w/v)) a baja velocidad por 3 segundos en una licuadora. Se filtró el homogenizado con 8 capas de gasa. Se centrifugó la suspensión filtrada en un rotor de giro fijo a 1500xg por 10 min en frascos de centrifuga de 250 ml. Se resuspendió la pastilla en 4 ml de medio de lavado (sacarosa 300mM y tricina 10mM pH 7.8) con la ayuda de un pincel. Se verificó la integridad de los cloroplastos con el microscopio óptico. Se colocaron 2 ml de la

pastilla resuspendida encima de un gradiente de sacarosa contenido en tubos Corex de 30 ml y se centrifugó en un rotor de giro libre a 2000xg por 15 min. El gradiente de sacarosa se hizo colocando consecutivamente 7 ml de sacarosa 51% (w/v), 7 ml de sacarosa 34% (w/v) y 7 ml de sacarosa 25% (w/v) en Tricina 10 mM pH 7.8. Después de centrifugar, se purificaron los cloroplastos embebidos en la interfase de la sacarosa 51% (w/v) y la sacarosa 34% (w/v) mediante aspersion. Los cloroplastos purificados se diluyeron con medio de lavado hasta tener una concentración final de 0.6M de sacarosa. Se centrifugó la suspensión diluida a 6000xg por 5 min en un rotor de giro libre. Se recuperó la pastilla y se verificó la integridad de los cloroplastos con el microscopio óptico. Por último, se guardaron a -70° C.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La cuantificación de proteínas se hizo de acuerdo con Bradford (1976), para lo cual se usó un kit de Bio-Rad. Se hicieron diluciones de las muestras de proteína en agua destilada estéril en un volumen final de 800 μ l. Se agregaron 200 μ l de buffer Bradford a cada una de las diluciones de proteínas. Se colocaron las muestras en el espectrofotómetro (Beckman Du 650) usando celdas de plástico y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. Usando una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) (1 mg/ml) se extrapolaron las cantidades de BSA con las cantidades de proteína en las muestras, determinando la concentración de proteína en las muestras.

TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS DESDE GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS A FILTROS DE MEMBRANA: DETECCIÓN INMUNOLÓGICA DE PROTEÍNAS INMOVILIZADAS (WESTERN BLOTTING)

Transferencia de proteínas desde geles de poliacrilamida-SDS a membranas de nitrocelulosa

A las alícuotas de cloroplastos se les agregó un volumen de buffer Laemmli 2X y se desnaturalizaron las proteínas a 100° C por 5 min. Se cargaron 10 μ g de proteínas totales ó 4.17 μ g de proteínas de cloroplasto desnaturalizadas en geles de poliacrilamida al 15% con 1% de SDS y se separaron electroforéticamente (cámara Hoefer) a 100 V durante 4 horas en buffer de corrida 1X.

La electrotransferencia de las proteínas se hizo completamente húmeda como se describe a continuación. Se puso en contacto el gel con la membrana de nitrocelulosa Hybond-C extra (Amersham) y se colocaron en medio de papel de cromatografía Whatman 3MM (tres piezas a cada lado), dos almohadillas porosas y dos soportes de plástico. El gel, la membrana de nitrocelulosa, el papel de

cromatografía Whatman 3MM y las almohadillas se pre-humedecieron en el buffer de transferencia. La construcción se sumergió en un tanque de electroforesis (equipado con electrodos de platino) con buffer de transferencia. La membrana de nitrocelulosa se colocó hacia el ánodo. Se aplicó una corriente eléctrica de 0.35 A por 60-90 min. La transferencia se llevó a cabo a 4° C.

Para verificar la transferencia de proteínas se observó la transferencia completa del marcador de carga preteñido Benchmark (Invitrogen) a la membrana de nitrocelulosa. También se tiñó la membrana con Ponceau S. Para esto, se incubó la membrana con una solución 1:10 de Ponceau S por 5-10 min a temperatura ambiente. Cuando las bandas de proteínas se hicieron visibles, verificando la transferencia, se lavó la membrana con agua destilada varias veces hasta remover todo el colorante.

La cantidad de proteína cargada en los geles de acrilamida-SDS se verificó con azul de Coomassie. Primero, se fijaron las proteínas al gel con una solución de metanol (50% v/v) y ácido acético glacial (10% v/v) durante media hora con agitación. Después se tiñó el gel con una solución de azul de Coomassie (0.025% w/v) y ácido acético glacial (10% v/v) durante una hora con agitación. Finalmente se destiñó el gel con ácido acético glacial al 10%. Para desecar el gel se incubó por 5 min en etanol al 70% y se colocó entre celofán para secarlo y guardarlo.

Bloqueo de los sitios de unión de los anticuerpos sobre la membrana de nitrocelulosa y unión de los anticuerpos primario y secundario a la proteína blanco

Se bloqueó la membrana con 5% (w/v) de leche en polvo sin grasa en solución salina a temperatura ambiente durante toda la noche. Se incubó la membrana por 30 min a temperatura ambiente con una dilución 1:1000 del anticuerpo anti-LOXH1 o anti-StAOS de *Solanum tuberosum* (obsequiados por el Dr. José Sánchez Serrano) en solución salina (PBS 1X, tween 20 0.2% y azida de sodio 0.02%) con agitación. Se lavó la membrana tres veces con solución salina por 8 min a temperatura ambiente con agitación. Después se incubó la membrana con el anticuerpo anti-conejo (1:1000 en solución salina) acoplado covalentemente a la fosfatasa alcalina por 30 min con agitación. Se lavó la membrana tres veces con solución salina sin azida de sodio por 8 min a temperatura ambiente con agitación.

Para detectar las proteínas blanco se utilizó el kit de sustrato BCIP/NBT (ZYMED). Se incubó la membrana con el sustrato BCIP/NBT (de acuerdo con lo especificado por el fabricante), el cual fue convertido *in situ* en un denso compuesto azul por la fosfatasa alcalina inmuno-localizada, detectando de ésta manera a las proteínas blanco en la membrana de nitrocelulosa.

RESULTADOS

LOS OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS AMPLIFICAN DE MANERA ESPECÍFICA A CADA UNO DE LOS GENES MEDIANTE PCR

Los genes que codifican para las LOXs en *A. thaliana* pertenecen a una familia génica y por lo tanto son muy parecidos a nivel tanto de nucleótidos como de aminoácidos. A nivel de cDNA se tienen identidades de entre el 45% y el 80% entre las cuatro lipoxigenasas (AtLOX2, AtLOX3, AtLOX4 y AtLOX6) que presentan un péptido de tránsito hacia el cloroplasto (Tabla II). En éste trabajo se quiere analizar mediante la RT-PCR la expresión inducida de cada uno de éstos cuatro genes de LOX, y de los genes *AOS* y *HPL* que utilizan como sustrato a los productos de la reacción de las LOXs, por lo cual, además de diseñar los oligonucleótidos sobre las regiones menos conservadas (los extremos 5' y 3') que amplifican toda la región codificante de cada gen, se decidió hacer un análisis de restricción con endonucleasas para verificar que efectivamente cada par de oligonucleótidos diseñados amplifica sólo al gen sobre el cual se diseñaron.

TABLA II. Identidades entre los cDNAs de las lipoxigenasas de *Arabidopsis thaliana* que presentan un péptido de tránsito hacia el cloroplasto.

Identidad (%)	<i>AtLOX3</i>	<i>AtLOX4</i>	<i>AtLOX6</i>
<i>AtLOX2</i>	48	48	45
<i>AtLOX3</i>	-	80	55
<i>AtLOX4</i>	-	-	54

Para ello se extrajo el DNA genómico de las hojas de la roseta de plantas silvestres de *A. thaliana*, el cual sirvió como templado para obtener mediante la PCR y usando los oligonucleotidos diseñados para cada gen, productos genómicos de un tamaño determinado (Figura 7 panel superior). Una vez amplificados, éstos productos genómicos se sometieron a la acción de endonucleasas de restricción (Figura 7 panel inferior), obteniendo para cada producto génico los tamaños esperados para cada uno de los fragmentos de restricción. Estos resultados muestran la especificidad de los productos amplificados mediante la PCR usando los oligonucleótidos diseñados, lo cual nos permite analizar la expresión específica de cada uno de los genes en estudio bajo las mismas condiciones.

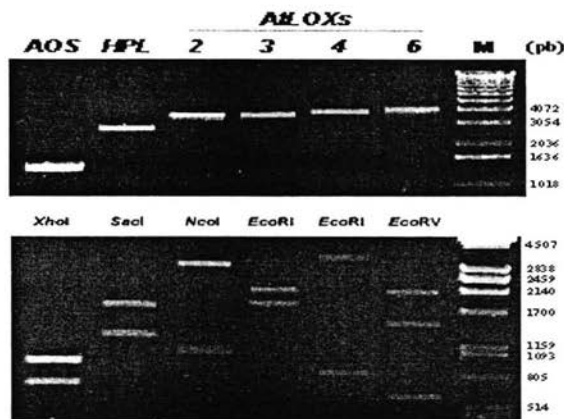


Figura 7. Amplificación de los genes *AOS*, *HPL*, *AtLOX2*, *AtLOX3*, *AtLOX4* y *AtLOX6* a partir de DNA genómico y análisis de restricción con endonucleasas. (panel superior) Amplificación de *AOS* (1567 pb), *HPL* (3206 pb), *AtLOX2* (3915 pb), *AtLOX3* (3874 pb), *AtLOX4* (4194 pb) y *AtLOX6* (4192 pb) a partir del DNA genómico de *A. thaliana* silvestre. (panel inferior) Análisis de restricción para cada uno de los productos genómicos amplificados. Tamaño de los fragmentos de restricción: 902 y 665 pb (*XhoI*); 1872 y 1208 pb (*SacI*); 2776 y 1089 pb (*NcoI*); 2089 y 1785 pb (*EcoRI*); 3208 y 802 pb (*EcoRI*); 2088, 1492 y 612 pb (*EcoRV*). Marcadores (M) de pares de bases (pb): DNA ladder (a r r i b a) y λPst

LA HERIDA MECÁNICA INDUCE LA ACUMULACIÓN DEL mRNA DE *AtLOX3* PERO NO INDUCE LA ACUMULACIÓN DE LOS mRNAs DE *AtLOX4* Y *AtLOX6*

Para estudiar el comportamiento de los genes *AtLOX2*, *AtLOX3*, *AtLOX4*, *AtLOX6*, *AOS* y *HPL* de la vía de las LOXs en respuesta al estrés ocasionado por la herida mecánica, se analizó la acumulación de sus transcritos a varios tiempos después de herir a las plantas. Para esto, se hirieron con pinzas las hojas de la roseta de plantas silvestres de *A. thaliana*. Se extrajo el RNA total de las hojas a las 0 (control sin herir), 0.5, 1, 2, 4 y 24 horas después de heridas y se analizó la acumulación de los transcritos de los genes mediante la RT-PCR. Para corroborar los resultados obtenidos por la RT-PCR se analizó también la expresión de estos mismos genes por Northern blot, utilizando como sonda los cDNAs de cada uno de los genes.

Los resultados obtenidos tanto por la RT-PCR como por Northern blot muestran patrones similares entre sí en la acumulación de los transcritos de los genes en respuesta a los tratamientos usados, lo cual indica que las sondas se hibridaron específicamente con los genes sobre los cuales se produjeron. Sin embargo, no se pudieron detectar los transcritos de algunos genes mediante

Northern blot, sugiriendo que dichos transcritos son poco abundantes y que sólo mediante su amplificación por la RT-PCR se pueden detectar. En las Figuras 8-13 se muestran los resultados obtenidos mediante ambas técnicas, excepto aquellos casos en los cuales no se observó la acumulación de los mRNAs de los genes mediante Northern blot.

Como se muestra en la Figura 8, se observó una acumulación basal del transcrito de *AtLOX2* en las hojas sin herir (tiempo 0). También se observó que la herida mecánica indujo la acumulación de los transcritos de los genes *AtLOX2* y *AtLOX3*. Para el caso de *AtLOX2*, se observó una acumulación gradual de su transcrito con un máximo de acumulación entre las 2 y 4 horas después de herir y una disminución importante a las 24 horas después de herir. Por su parte, el transcrito de *AtLOX3* apareció a las 0.5 y se mantuvo hasta las 2 horas después de herir. También se analizó la acumulación de los transcritos de *AtLOX4* y *AtLOX6*, sin embargo, no se observó acumulación alguna de sus transcritos ni en las plantas sin herir (tiempo 0) ni en las plantas heridas.

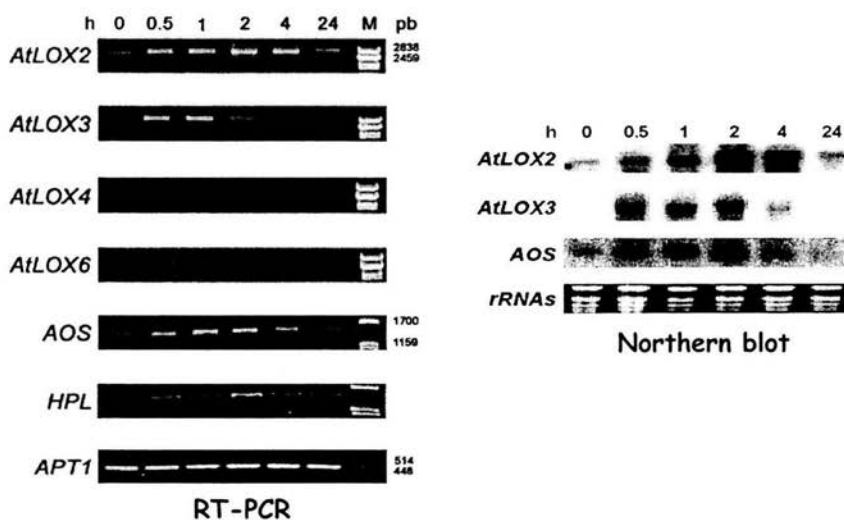


Figura 8. Análisis de la acumulación del mRNA de los genes *AtLOX2*, *AtLOX3*, *AtLOX4*, *AtLOX6*, *AOS* y *HPL* en plantas silvestres de *A. thaliana* heridas. Se hirieron las hojas de la roseta de plantas de 4 semanas de edad con pinzas. Se extrajo el RNA total de las hojas a las 0, 0.5, 1, 2, 4 y 24 horas después de heridas. La RT-PCR (panel izquierdo) se realizó con los oligonucleotidos descritos en materiales y métodos. Se usó como control de carga un fragmento de 478 pares de bases (pb) de la adenosina fosforibosiltransferasa 1 (*APT1*). Marcador (M) de pares de bases: λ Pst. h: horas después de herir. Para el análisis Northern blot (panel derecho) se corrieron 10 μ g de RNAs totales de cada muestra en un gel desnaturizante y se transfirieron a una membrana de nylon. Se usaron sondas radioactivas amplificadas mediante la PCR usando los oligonucleótidos diseñados para cada gen (ver materiales y métodos). *rRNAs*: control de carga.

Al igual que para *AtLOX2*, se observó una acumulación basal de mRNA de AOS en las hojas sin herir (tiempo 0) (Figura 8). Además, también se encontró que la herida indujo la acumulación de los mRNAs de los genes AOS y *HPL* (Figura 8). El mRNA de AOS presentó un patrón de acumulación constante desde las 0.5 y hasta las 2 horas después de herir. Por otra parte, el mRNA de *HPL* mostró un comportamiento de campana, alcanzando un máximo de acumulación a las 2 horas después de herir. Por lo tanto, de acuerdo con éstos resultados, además de los genes *AtLOX2*, AOS y *HPL*, también el gen *AtLOX3* responde al estrés ocasionado por la herida, mientras que los genes *AtLOX4* y *AtLOX6* no participan en la respuesta de defensa de la planta a dicho estrés.

LA ACUMULACIÓN DEL mRNA DE LOS GENES *HPL*, *AtLOX2* Y *AtLOX3*, Y AOS ES DEPENDIENTE, CODEPENDIENTE E INDEPENDIENTE, RESPECTIVAMENTE, DEL ÁCIDO JASMÓNICO PRODUCIDO *in planta* EN RESPUESTA A LA HERIDA

Se ha mostrado que una de las consecuencias del estrés ocasionado por la herida en las plantas silvestres de *A. thaliana* es el aumento en los niveles endógenos del JA (Bell *et al.*, 1995). Por lo tanto, para elucidar si el JA inducido por la herida tiene algún efecto sobre la vía de las lipoxigenasas, se analizó la acumulación de los mRNAs de genes que participan en ésta vía en respuesta a la herida tanto en plantas transgénicas con cosupresión de *AtLOX2* (incapaces de acumular los niveles de JA observados en las plantas silvestres en respuesta a la herida) como en plantas mutantes *coi1-1* (insensibles a los jasmonatos). Para ello, se extrajo el RNA total de las hojas de la roseta de ambos tipos de plantas después de 0 (control sin herir), 0.5, 1, 2, 4 y 24 horas de heridas, y se analizó la acumulación del transcrito de los genes a cada uno de éstos tiempos mediante la RT-PCR y se corroboró por Northern blot.

En la Figura 9 se observan niveles muy reducidos del transcrito de *AtLOX2* en las plantas transgénicas, lo cual nos indicó que efectivamente trabajamos con plantas que tenían cosuprimido al gen *AtLOX2*. En éstas plantas transgénicas, el transcrito de *AtLOX3* se acumuló entre las 0.5 y 1 hora después de herir con niveles aparentemente menores a los observados en las plantas silvestres heridas. En contraste, el patrón de acumulación del transcrito de AOS fue similar al observado en las plantas silvestres heridas (Figura 9). También se analizó la acumulación de los transcritos tanto de *HPL* como de *AtLOX4* y *AtLOX6* en éstas plantas transgénicas en respuesta a la herida, sin embargo no se observó la acumulación de su transcrito bajo éstas condiciones. Estos resultados nos indican que se requiere de la expresión de *AtLOX2* y por consiguiente del JA inducido por la herida para que se expresen los genes *HPL* y *AtLOX3* de manera comparable con las plantas silvestres.

En las plantas mutantes *coi1-1* (Figura 10) insensibles a los jasmonatos se observó una acumulación constante del transcrito de *AtLOX2* entre las 1 y 4 horas

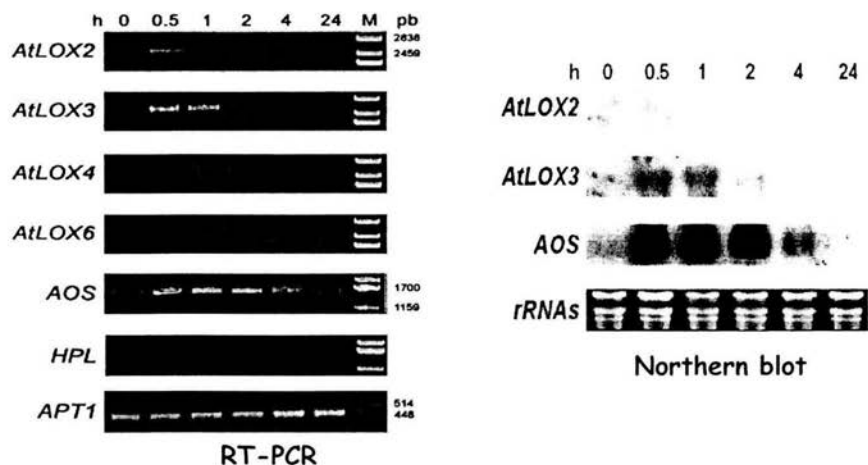


Figura 9. La acumulación de los transcritos de los genes *HPL*, *AtLOX3* y *AOS* en respuesta a la herida es dependiente, codependiente e independiente, respectivamente, de la producción *in planta* del JA inducida por la herida. Se utilizaron plantas transgénicas con cosupresión de *AtLOX2*. La herida, la RT-PCR (panel izquierdo) y el Northern blot (panel derecho) se hicieron como se describen en materiales y métodos. *APT1*: control de carga para la RT-PCR. Marcador (M) de pares de bases (pb): λ Pst. *rRNAs*: control de carga para el northern blot. h: horas después de herir.

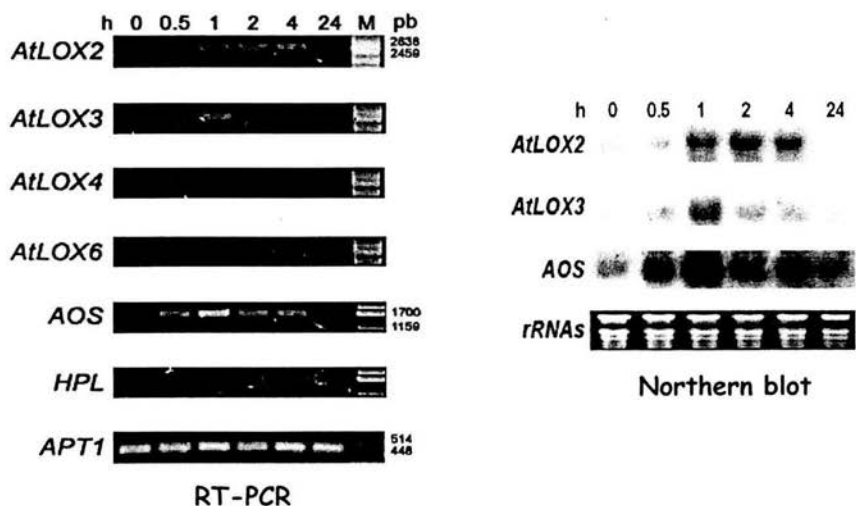


Figura 10. La acumulación de los mRNAs de los genes *HPL*, *AtLOX2* y *AtLOX3*, y *AOS* en respuesta a la herida es dependiente, codependiente e independiente, respectivamente, de la percepción del JA por la planta. Se utilizaron plantas mutantes *coil-1* insensibles a los jasmonatos. La herida, la RT-PCR (panel izquierdo) y el Northern blot (panel derecho) se hicieron como se describen en materiales y métodos. *APT1*: control de carga para la RT-PCR. Marcador (M) de pares de bases (pb): λ Pst. *rRNAs*: control de carga para el Northern blot. h: horas después de herir.

después de herir, mientras que el transcrito de *AtLOX3* se observó escasamente de manera puntual a la hora después de herir. Sin embargo, el transcrito de AOS observado en las mutantes *coi1-1* heridas (Figura 10) presentó un patrón de acumulación similar al observado en las plantas silvestres heridas (Figura 8). Además, al igual que en las plantas cosupresoras de *AtLOX2*, en las plantas mutantes *coi1-1* tampoco se observó la acumulación de los transcritos de los genes *HPL*, *AtLOX4* y *AtLOX6* en respuesta a la herida. De acuerdo con éstos resultados, se tiene que la acumulación del transcrito tanto de *AtLOX2* como de *AtLOX3* en respuesta a la herida es parcialmente dependiente de la percepción del JA inducido por la herida; mientras que la acumulación del transcrito de AOS es independiente de dicho JA. Estos resultados también nos indican que la planta necesita percibir al JA inducido por la herida para que exprese el gen *HPL*.

LOS COMPUESTOS VOLÁTILES METIL JASMONATO Y TRANS-2-HEXENAL INDUCEN LA ACUMULACIÓN DE LOS TRANSCRITOS DE LOS GENES *AtLOX2*, *AtLOX3*, *AtLOX6*, AOS y *HPL*

El MeJA y el trans-2-hexenal son dos compuestos volátiles derivados de la vía de las LOXs mediante la acción de las enzimas AOS y HPL, respectivamente. Para determinar de que manera afecta la aplicación exógena de éstos compuestos a la expresión de genes de la vía de las LOXs, se sometieron plantas silvestres de *A. thaliana* de 4 semanas de edad a la volatilización de dichos compuestos como se describe en materiales y métodos. Después de 0 (plantas sin exponer), 0.5, 1, 2, 4 y 24 horas de exposición a los compuestos volátiles, se extrajo el RNA total de las hojas de la roseta de las plantas y se analizó la acumulación de los mRNAs de los genes de la vía de las LOXs mediante la RT-PCR y Northern blot.

Como se observa en la Figura 11, los niveles del mRNA de *AtLOX2* aumentaron a partir de las 0.5 horas de exposición de las plantas al MeJA y se mantuvieron hasta las 2 horas para aumentar nuevamente a las 24 horas de exposición. El mensajero de *AtLOX3* se observó a las 0.5 horas de exposición al MeJA; mientras que el mensajero de *AtLOX6* tuvo su mayor acumulación a las 0.5 horas y después disminuyó para acumularse constantemente hasta las 24 horas de exposición. Sin embargo, no se observó acumulación alguna del mensajero de *AtLOX4* en respuesta al MeJA. Por otra parte, el mensajero de AOS mostró dos picos de acumulación, uno a las 2 horas y el otro a las 24 horas de exposición al MeJA, mientras que el mensajero de *HPL* tuvo su máximo de acumulación a la hora y disminuyó gradualmente hasta las 24 horas de exposición a dicho compuesto volátil.

La exposición al compuesto volátil trans-2-hexenal (Figura 12) indujo la acumulación del transcrito de *AtLOX2* entre las 0.5 y la hora, observándose una acumulación posterior a las 24 horas de exposición a éste compuesto volátil. El transcrito de *AtLOX3* se observó a las 0.5 horas de exposición al trans-2-hexenal, mientras que el transcrito de *AtLOX6* se acumuló desde las 0.5 horas alcanzando

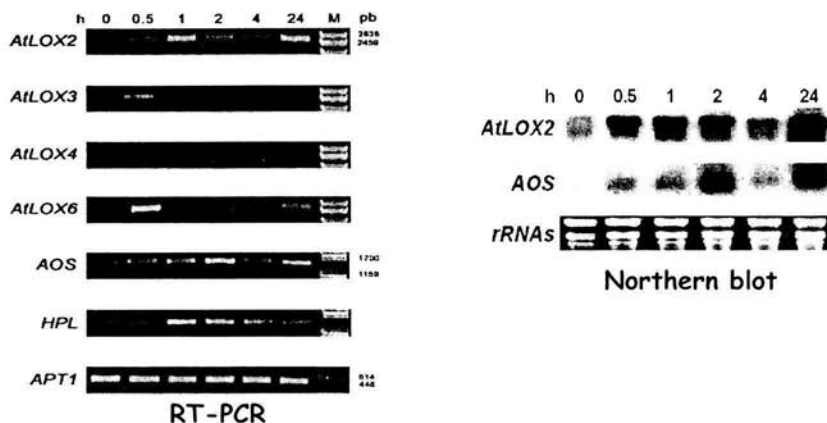


Figura 11. Los genes *AtLOX2*, *AtLOX3*, *AtLOX6*, *AOS* y *HPL* responden transcripcionalmente al compuesto volátil metil jasmonato. Las plantas silvestres de *A. thaliana* de 4 semanas de edad se expusieron a 10 μ M del compuesto volátil MeJA. Las plantas control se trataron sólo con etanol (Figura 18). Se extrajo el RNA total de las hojas de la roseta a las 0 (sin exponer), 0.5, 1, 2, 4 y 24 horas de exposición al MeJA. La RT-PCR (panel izquierdo) y el Northern blot (panel derecho) se hicieron como se describen en materiales y métodos. *APT1*: control de carga para la RT-PCR. Marcador (M) de pares de bases (pb): λ Pst. *rRNAs*: control de carga para el Northern blot. h: horas de exposición.

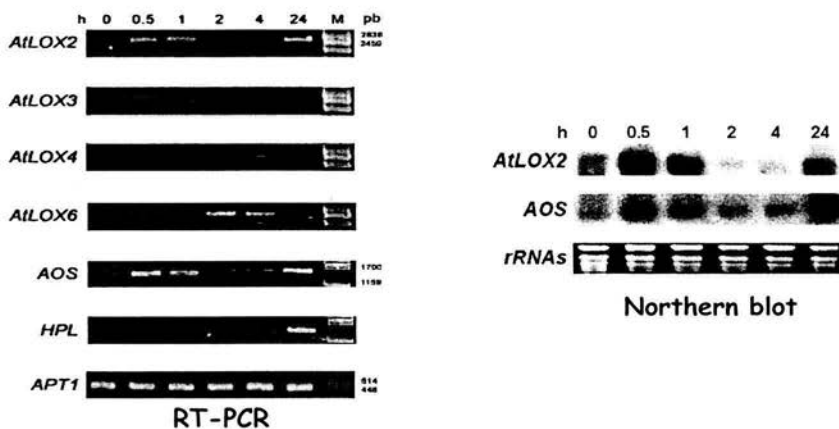


Figura 12. Los genes *AtLOX2*, *AtLOX3*, *AtLOX6*, *AOS* y *HPL* responden transcripcionalmente al compuesto volátil trans-2-hexenal. Las plantas silvestres de *A. thaliana* de 4 semanas de edad se expusieron a 10 μ M del compuesto volátil trans-2-hexenal. Las plantas control se trataron sólo con etanol (Figura 18). Se extrajo el RNA total de las hojas de la roseta a las 0 (sin exponer), 0.5, 1, 2, 4 y 24 horas de exposición al trans-2-hexenal. La RT-PCR (panel izquierdo) y el Northern blot (panel derecho) se hicieron como se describen en materiales y métodos. *APT1*: control de carga para la RT-PCR. Marcador (M) de pares de bases (pb): λ Pst. *rRNAs*: control de carga para el Northern blot. h: horas de exposición.

un máximo de acumulación entre las 2 y 4 horas de exposición a dicho compuesto volátil. Sin embargo, tampoco se observó acumulación del transcrito de *AtLOX4* en respuesta al trans-2-hexenal en los tiempos analizados. Por su parte, el transcrito de *AOS* se comportó de manera similar al transcrito de *AtLOX2* durante la exposición al trans-2-hexenal, mientras que el transcrito de *HPL* presentó una acumulación gradual desde las 0.5 hasta las 24 horas de exposición a éste compuesto volátil.

Como resultado de la exposición de las plantas a los compuestos volátiles MeJA y trans-2-hexenal se acumularon los mensajeros de *AtLOX2* y *AtLOX3*, sin embargo, los tiempos de acumulación no reflejan a aquellos obtenidos durante la inducción con la herida. Interesantemente, el patrón de acumulación del mensajero de *AOS* en presencia del MeJA presenta un máximo de acumulación diferente al observado en presencia del trans-2-hexenal, y diferente también al observado en respuesta a la herida. Por otro lado, mediante la aplicación exógena del MeJA y del trans-2-hexenal, se observa la acumulación del mensajero de *AtLOX6*. Así, se tiene que el MeJA y el trans-2-hexenal aplicados exógenamente regulan transcripcionalmente a los genes de la vía de las LOXs, entre los cuales se encuentran *AtLOX2*, *AOS* y *HPL*, los cuales participan en la biosíntesis de dichos compuestos volátiles.

EL HONGO NECROTRÓFICO *Alternaria brassicicola* INDUCE LA ACUMULACIÓN DE LOS TRANSCRITOS DE LOS GENES *AtLOX2* Y *AOS*

La inoculación de plantas silvestres de *A. thaliana* con el hongo necrotrófico *A. brassicicola* induce un aumento en los niveles endógenos del JA en las plantas (Pennincks *et al.*, 1998). Debido a que algunos genes de la vía de las LOXs participan en la biosíntesis del JA, se quiere analizar la regulación de ésta vía como parte de la respuesta de la planta al estrés biótico ocasionado por el hongo. Así que se analizó la acumulación de los transcritos de genes que participan en dicha vía. Para ello, se inocularon plantas silvestres de *A. thaliana* de 4 semanas de edad con el hongo mediante la aspersión de esporas sobre las hojas de la roseta (ver materiales y métodos). Después de inoculadas, se extrajo el RNA total de las hojas de la roseta de las plantas después de 0 (sin inocular), 12, 24, 48 y 72 horas y se analizó la acumulación de los transcritos de los genes de interés mediante la RT-PCR y Northern blot.

De todos los genes analizados (*AtLOX2*, *AtLOX3*, *AtLOX4*, *AtLOX6*, *AOS* y *HPL*) en respuesta al hongo *A. brassicicola*, sólo se observó la acumulación gradual de los transcritos de *AtLOX2* y *AOS* (Figura 13), los cuales codifican para enzimas que participan en la biosíntesis del JA. Por lo tanto, éstos resultados sugieren que el aumento en los niveles endógenos del JA en respuesta al hongo *A. brassicicola* pudiera estar regulado por la expresión de los genes que participan en la biosíntesis de dicho compuesto.

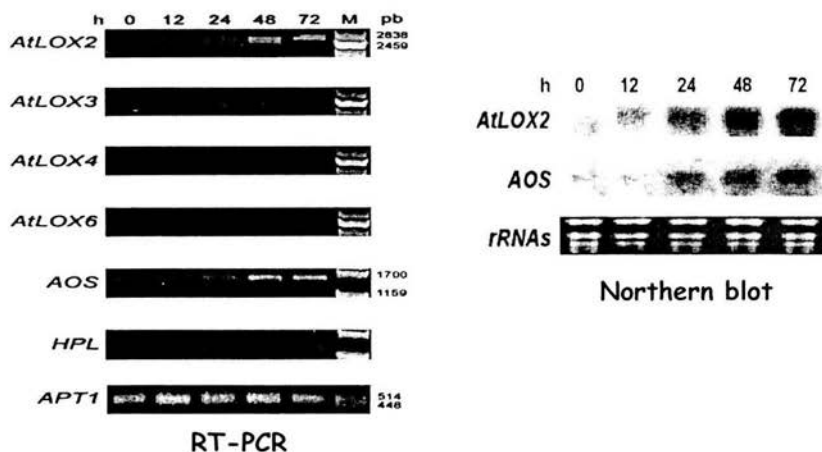


Figura 13. El hongo necrotrófico *Alternaria brassicicola* induce la expresión de los genes *AtLOX2* y *AOS*. Se inocularon las hojas de la roseta de plantas silvestres de *A. thaliana* de 4 semanas de edad con las esporas (5×10^5 esporas ml^{-1}) del hongo. Se extrajo el RNA total de las hojas a las 0 (sin inocular), 12, 24, 48 y 72 horas después de inoculadas. La RT-PCR (panel izquierdo) y el Northern blot (panel derecho) se hicieron como se describen en materiales y métodos. *APT1*: control de carga para la RT-PCR. Marcador (M) de pares de bases (pb): λ Pst. *rRNAs*: control de carga para el Northern blot. h: horas después de inocular.

LA ACUMULACIÓN CONSTITUTIVA DE AOS ES INDEPENDIENTE DE AtLOX2 Y DEL ÁCIDO JASMÓNICO PRODUCIDO *in planta* EN RESPUESTA A LA HERIDA

Las enzimas de la vía de las LOXs participan en la producción de metabolitos secundarios importantes para la defensa de las plantas contra el estrés ocasionado por la herida, tales como el JA y el trans-2-hexenal. Para estudiar el comportamiento de las proteínas LOX y AOS de la vía de las LOXs en la respuesta de defensa de la planta se analizó su acumulación en extractos crudos de plantas silvestres de *A. thaliana* heridas, mediante la técnica de Western blot. Para ello, se extrajeron las proteínas totales de las hojas de las rosetas de las plantas a las 0 (sin herir), 0.5, 1, 2, 4 y 24 horas después de heridas. Se separaron las proteínas totales mediante electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para incubarse con los anticuerpos anti-LOXH1 y anti-StAOS de *Solanum tuberosum*.

TABLA III. Identities and similarities between the amino acid sequences of the lipoxygenases of *A. thaliana* and of *S. tuberosum* that present a transit peptide to the chloroplast.

	LOXH1		LOXH3		AtLOX2		AtLOX3		AtLOX4	
	Identidad (%)	Similitud (%)	Identidad (%)	Similitud (%)	Identidad (%)	Similitud (%)	Identidad (%)	Similitud (%)	Identidad (%)	Similitud (%)
LOXH3	48	66	-	-	-	-	-	-	-	-
AtLOX2	58	67	46	56	-	-	-	-	-	-
AtLOX3	48	57.5	74	80	46	56	-	-	-	-
AtLOX4	47	57	74	79	47	57	84	87	-	-
AtLOX6	46.5	56	52	61	50	59	51	60	51	61

La comparación a nivel de estructura primaria entre las LOXs de *A. thaliana* (AtLOX2, AtLOX3, AtLOX4 y AtLOX6) y de *S. tuberosum* (LOXH1 y LOXH3) que presentan un péptido de tránsito hacia el cloroplasto muestra que AtLOX2 presenta la mayor identidad y similitud con la LOXH1 (Tabla III). Además, como se muestra en la Tabla III, AtLOX3 presenta la mayor identidad y similitud con la LOXH3, la cual no es reconocida por el anticuerpo anti-LOXH1 (Royo *et al.*, 1999), aún cuando hay una identidad del 48% y una similitud del 57% entre las secuencias de aminoácidos de la LOXH1 y la LOXH3. Éstos datos sugieren que el anticuerpo anti-LOXH1 de *S. tuberosum* reconocería preferentemente a la AtLOX2 de *A. thaliana*.

Como se observa en la Figura 14, el anticuerpo anti-LOXH1 reconoció a una proteína que se mantuvo constitutiva desde las 0 (plantas sin herir) hasta las 24 horas después de la herida. Sin embargo, el anticuerpo anti-LOXH1 no reconoció proteína alguna en las plantas transgénicas de *A. thaliana* con cosupresión de *AtLOX2* (Figura 15), sugiriendo que dicho anticuerpo reconoce a la proteína AtLOX2. No obstante, en las plantas silvestres de *A. thaliana* heridas se acumula, además del transcrito de *AtLOX2*, el transcrito de *AtLOX3* (Figura 7), por lo que el anticuerpo anti-LOXH1 pudiera también estar reconociendo a la proteína AtLOX3. Por lo tanto, hasta que se demuestre experimentalmente que el anticuerpo anti-LOXH1 no reconoce a la proteína AtLOX3, nos referiremos a la proteína detectada por dicho anticuerpo como AtLOX.

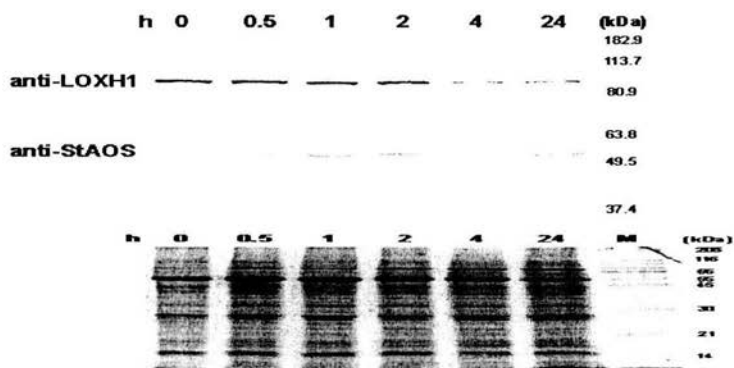


Figura 14. Western blot de las proteínas AtLOX y AOS en plantas silvestres de *A. thaliana* heridas. Se hirieron las hojas de la roseta de las plantas con pinzas y se extrajeron las proteínas totales a las 0 (sin herir), 0.5, 1, 2, 4 y 24 horas después de herir (h). (panel superior) Se transfirieron las proteínas totales a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con los anticuerpos anti-LOXH1 y anti-StAOS de *S. tuberosum*. (panel inferior) Control de carga: 10 μ g de proteínas totales en gel desnaturizante de poliacrilamida al 15% teñido con azul de Coomassie.

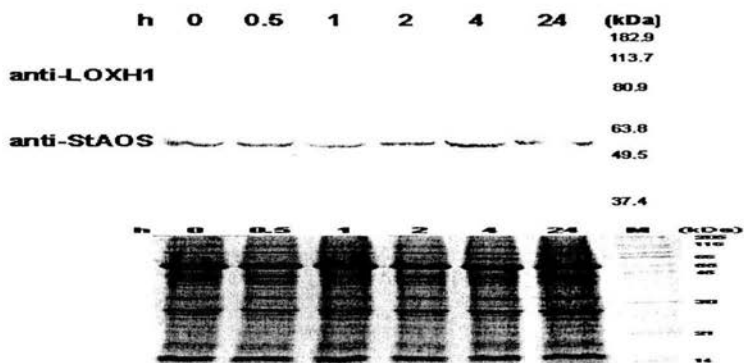


Figura 15. Western blot de las proteínas AtLOX y AOS en plantas transgénicas de *A. thaliana* con cosupresión de *AtLOX2* en respuesta a la herida mecánica. Se hirieron las hojas de la roseta de las plantas con pinzas y se extrajeron las proteínas totales a las 0 (sin herir), 0.5, 1, 2, 4 y 24 horas después de herir (h). (panel superior) Se transfirieron las proteínas totales a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con los anticuerpos anti-LOXH1 y anti-StAOS de *S. tuberosum*. (panel inferior) Control de carga: 10 μ g de proteínas totales en gel desnaturizante de poliacrilamida al 15% teñido con azul de Coomassie.

Así mismo, la comparación entre las secuencias de aminoácidos de las proteínas AOS de *A. thaliana* y de *S. tuberosum* muestra que dichas proteínas son muy parecidas entre sí, presentando una identidad del 63% y una similitud del 70.5%. Además, hay sólo una AOS en *A. thaliana*. De acuerdo con éstos datos, el anticuerpo anti-StAOS de *S. tuberosum* reconocería específicamente a la AOS de *A. thaliana*.

La proteína AOS de *A. thaliana* se detectó constitutivamente desde las 0 (plantas sin herir) hasta las 24 horas después de la herida tanto en las plantas silvestres (Figura 14) como en las plantas transgénicas con cosupresión de *AtLOX2* (Figura 15). Por lo tanto, de acuerdo con éstos resultados, la acumulación constitutiva de la proteína AOS es independiente de la proteína *AtLOX2* y del JA producido *in planta* en respuesta a la herida.

COI1 REGULA POSITIVAMENTE LA ACUMULACIÓN DE AOS EN LA RESPUESTA DE DEFENSA DE *Arabidopsis thaliana* A LA HERIDA MECÁNICA

COI1 es una proteína con caja F requerida para la respuesta de *A. thaliana* a los jasmonatos (Xu *et al.*, 2002). Se ha mostrado que las proteínas con caja F funcionan como receptoras de proteínas reguladoras que después de ser ubiquitinadas son transferidas al proteasoma para su degradación (Devoto *et al.*, 2002). Por lo tanto, para determinar de que manera afecta COI1 la respuesta de las enzimas *AtLOX* y AOS a los jasmonatos producidos *in planta* en respuesta a la herida, se analizó la acumulación de éstas enzimas durante la respuesta de defensa de plantas mutantes *coi1-1* heridas. Para ello, se extrajeron las proteínas totales de las hojas de la roseta de las plantas mutantes *coi1-1* a las 0 (sin herir), 1 y 2 horas después de heridas. Se separaron las proteínas mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para incubarse con los anticuerpos anti-*LOXH1* y anti-StAOS de *S. tuberosum*.

Como se muestra en la Figura 16, *AtLOX* estuvo presente en las plantas mutantes *coi1-1* sin herir y se mantuvo constitutivamente hasta las 2 horas después de la herida. La proteína AOS también se encontró en las plantas mutantes *coi1-1* sin herir, sin embargo, su acumulación disminuyó agudamente a la hora y apenas se percibió a las 2 horas después de herir. De ésta manera, nuestros resultados muestran que se requiere de la proteína COI1 para mantener los niveles de acumulación de AOS en la respuesta de defensa de *A. thaliana* a la herida.

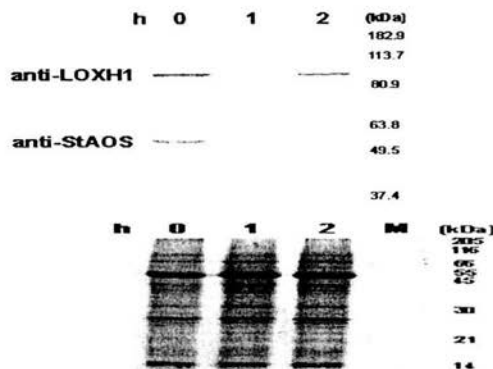


Figura 16. La proteína COII es requerida para mantener los niveles de acumulación de las enzimas AtLOX y AOS en la respuesta de *A. thaliana* a la herida mecánica. (panel superior) Western blot de las proteínas AtLOX y AOS en plantas mutantes *coil-1* heridas. Se hirieron las hojas de la roseta de las plantas con pinzas y se extrajeron las proteínas totales a las 0 (sin herir), 1 y 2 horas después de herir (h). Se transfirieron las proteínas totales a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con los anticuerpos anti-LOXH1 y anti-StAOS de *S. tuberosum*. (panel inferior) Control de carga: 10 µg de proteínas totales en gel desnaturalizante de poliacrilamida al 15% teñido con azul de Coomassie.

DETECCIÓN INMUNOLÓGICA DE AtLOX Y AOS EN EXTRACTOS DE CLOROPLASTOS DE *Arabidopsis thaliana*

Las enzimas AtLOX2 y AOS de *A. thaliana* presentan un péptido de tránsito hacia el cloroplasto en su extremo amino terminal. La localización de AtLOX2 en los cloroplastos ya ha sido demostrada (Bell *et al.*, 1995), sin embargo, esto no ha sido demostrado para la AOS. En la inmunolocalización descrita en la sección anterior se analizó la presencia de AtLOX (probablemente AtLOX2) y AOS en extractos crudos de hojas y se observó una acumulación constitutiva de ambas proteínas en respuesta a la herida. Por lo tanto, para detectar la presencia de dichas enzimas en el cloroplasto y analizar su comportamiento en dicho organelo en respuesta a la herida mecánica, se analizó su acumulación en extractos de cloroplastos de plantas silvestres de *A. thaliana* heridas, mediante la técnica de Western blot. Para ello, se extrajeron los cloroplastos de las hojas de la roseta de las plantas mediante gradientes de sacarosa a las 0 (sin herir), 0.5 y 2 horas después de herir. Las proteínas totales se extrajeron de hojas sin herir. Se separaron las proteínas totales y de los extractos de cloroplastos mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para incubarse con los anticuerpos anti-LOXH1 y anti-StAOS de *S. tuberosum*.

Como se observa en la Figura 17 (panel izquierdo), el análisis Western blot mostró un enriquecimiento de las proteínas AtLOX y AOS en los extractos de cloroplastos respecto de las proteínas totales, tal como se esperaba para

proteínas con péptido de tránsito hacia el cloroplasto. Además, se observó un ligero incremento de AtLOX en las proteínas de los cloroplastos en respuesta a la herida. Estas observaciones se corroboraron mediante un análisis densitométrico (Figura 17, panel derecho), el cual muestra que hubo un incremento de AtLOX del 25% en las proteínas de los cloroplastos respecto de las proteínas totales, y que los niveles de AtLOX en los extractos de cloroplastos aumentaron aproximadamente 0.7 veces a las 2 horas después de herir. Para el caso de AOS, el análisis densitométrico (Figura 17, panel derecho) muestra que hay aproximadamente 15 veces más AOS en los extractos de cloroplastos que en las proteínas totales. Sin embargo, el estrés ocasionado por la herida no indujo un cambio significativo en los niveles de AOS en los cloroplastos. Por lo tanto, la detección inmunológica de las proteínas AtLOX y AOS de *A. thaliana* muestra un enriquecimiento de ambas en los cloroplastos.

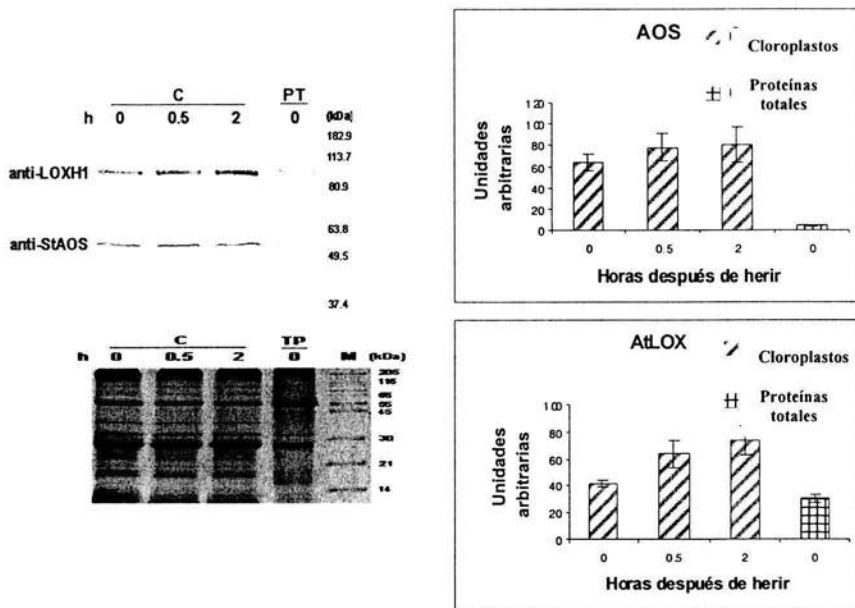


Figura 17. Detección inmunológica de AtLOX y AOS en extractos de cloroplastos de plantas silvestres de *A. thaliana*. (panel izquierdo arriba) Western blot de las proteínas AtLOX y AOS en plantas silvestres de *A. thaliana* heridas. Se hirieron las hojas de la roseta de las plantas con pinzas y se extrajeron los cloroplastos (C) mediante gradientes de sacarosa a las 0 (sin herir), 0.5 y 2 horas después de herir (h). Las proteínas totales (PT) se extrajeron de hojas sin herir (tiempo 0) como se describe en materiales y métodos. Se transfirieron las proteínas totales y de cloroplasto a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con los anticuerpos anti-LOXH1 y anti-StAOS de *S. tuberosum*. (panel izquierdo abajo) Control de carga: 4.17 µg de proteínas totales y de los cloroplastos en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 15% teñido con azul de Coomassie. (panel derecho) Análisis densitométrico de los niveles de AtLOX y AOS en la membrana de nitrocelulosa realizado con el programa KODAK 1D.

RESULTADOS COMPLEMENTARIOS

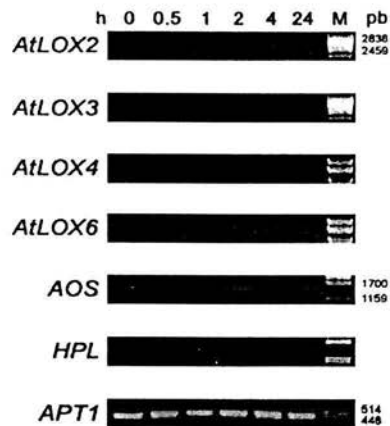


Figura 18. Análisis de la respuesta de los genes *AtLOX2*, *AtLOX3*, *AtLOX4*, *AtLOX6*, *AOS* y *HPL* al etanol. Las plantas silvestres de *A. thaliana* de 4 semanas de edad se expusieron a la volatilización de 0.1M de etanol. Se extrajo el RNA total de las hojas de la roseta a las 0 (sin exponer), 0.5, 1, 2, 4 y 24 horas de exposición al etanol. La RT-PCR se hizo como se describe en materiales y métodos. *APT1*: control de carga. Marcador (M) de pares de bases (pb): λ Pst. h: horas de exposición.

DISCUSIÓN

Respuesta de los genes de la vía de las lipoxigenasas a la herida

Se ha reportado que la herida induce la acumulación de los transcritos de los genes *AtLOX2* (Bell y Mullet, 1993), *AOS* (Kubigsteltig *et al.*, 1999) y *HPL* (Bate *et al.*, 1998). Interesantemente, nosotros encontramos que la herida también induce la acumulación del transcrito de *AtLOX3* (Figura 8), lo cual indica la participación de éste gen en la respuesta de *A. thaliana* a dicho estrés.

Por otra parte, las plantas silvestres de *A. thaliana* incrementan sus niveles endógenos de JA en respuesta a la herida mecánica (Bell *et al.*, 1995; Stintzi *et al.*, 2001). Por lo tanto, para determinar de qué manera afecta éste JA inducido por la herida a la expresión de los genes de la vía de las LOXs, analizamos la acumulación de los transcritos de éstos en respuesta a la herida, tanto en plantas transgénicas con cosupresión de *AtLOX2*, incapaces de acumular JA en respuesta a la herida (Bell *et al.*, 1995), como en plantas mutantes *coi1-1* insensibles al JA (Feys *et al.*, 1994). Los resultados obtenidos con las plantas transgénicas (Figura 9) muestran una acumulación muy reducida del transcrito de *AtLOX2*, lo cual nos indica que efectivamente trabajamos con plantas cosuprimidas en ese gen. También se muestra en estas plantas una disminución en los niveles del transcrito de *AtLOX3* en respuesta a la herida, en comparación con las plantas silvestres, indicando que la expresión de *AtLOX3* depende, además del JA, de otro u otros compuestos inducidos también por la herida, tales como el trans-2-hexenal (Bate y Rothstein, 1998) y el OPDA (Stelmach *et al.*, 2001) liberado del MGDG-O de las membranas de los cloroplastos (Tabla I; Figura 5).

En las plantas mutantes *coi1-1* heridas (Figura 10) se observó una disminución en la acumulación de los transcritos de *AtLOX2* y *AtLOX3*, respecto de lo observado en las plantas silvestres. Éstos resultados sugieren que la acumulación de los transcritos de éstos genes en respuesta a la herida depende de la percepción del JA por la planta y de algún otro compuesto inducido por la herida, tales como los mencionados anteriormente. Además de ser inducido por la herida, el OPDA es un muy buen candidato debido a que regula, por sí mismo, la expresión de genes que responden a la herida en *A. thaliana* (Stintzi *et al.* 2001).

De acuerdo con los resultados mostrados en las Figuras 8-10, los patrones de acumulación de los transcritos de *AtLOX2* y *AtLOX3* son muy parecidos entre sí y por consiguiente parecen estar regulados por procesos similares en la respuesta a la herida. Este comportamiento indica un posible evento de redundancia en la función de ambos genes en la respuesta a dicho estrés. El estudio de la mutante *AtLOX3* en respuesta a la herida ayudará a elucidar éste posible fenómeno de redundancia.

Como se muestra en las Figuras 8-10, el transcrito de AOS presentó un patrón de acumulación similar tanto en las plantas silvestres como en las cosupresoras de *AtLOX2* y en las mutantes *coi1-1* en respuesta a la herida. Estos resultados indican que la acumulación del transcrito de AOS en respuesta a la herida no depende ni de la producción ni de la percepción del JA producido *in planta* en respuesta a dicho estrés. No obstante, Laudert y Weiler (1998) observaron la acumulación del transcrito de AOS en respuesta al OPDA, precursor del JA, lo que parecería contradecir a nuestros resultados. Sin embargo, Stelmach *et al.* (2001) encontraron que más del 90% del OPDA en *A. thaliana* se encuentra esterificado en el MGDG-O de las membranas de los cloroplastos (Figura 5) y que puede ser liberado mediante la acción de lipasas, explicando de ésta manera el rápido aumento en los niveles de OPDA cuando las hojas se hieren. Por lo tanto, de acuerdo con estas observaciones, la inducción de la acumulación del transcrito de AOS en respuesta a la herida mostrada en nuestros resultados (Figuras 8-10) podría deberse al OPDA liberado de las membranas de los cloroplastos y no al OPDA formado durante la síntesis *de novo* del JA, o a algún otro compuesto producido también en respuesta a la herida (Tabla I).

Los resultados observados en la Figura 8 muestran que la herida indujo la acumulación del transcrito de *HPL* en las plantas silvestres de *A. thaliana*, confirmando lo reportado por Bate *et al.* (1998). Sin embargo, la herida no indujo la acumulación del transcrito de *HPL* ni en las plantas cosupresoras de *AtLOX2* (Figura 9) ni en las plantas mutantes *coi1-1* (Figura 10). De ésta manera, nuestros resultados indican que la acumulación del transcrito de *HPL* en respuesta a la herida depende tanto de alguno o algunos de los intermediarios en la biosíntesis del JA (tales como *AtLOX2* y el OPDA (Figura 5)), como de la percepción del JA mismo por la planta. Los ensayos realizados en *Citrus jambhiri* mostraron que la herida indujo la acumulación del transcrito de *HPL* y la actividad de la enzima, (Gomi *et al.*, 2003), observándose la mayor acumulación de transcrito a las 2 horas (similar a nuestros resultados en *A. thaliana*) y la mayor actividad de ésta enzima a las 12 horas después de herir. Por lo tanto, de acuerdo con lo anterior, una vez producida la enzima, su participación en la respuesta de defensa de la planta herida se regula mediante la inducción de su actividad. En *A. thaliana* se ha demostrado la actividad preferencial de la enzima *HPL* por los sustratos derivados del ácido α -linolénico (Bate *et al.*, 1998), pero se desconoce si la herida induce la actividad de dicha enzima en esta planta.

Respuesta de los genes de la vía de las lipoxigenasas a los compuestos volátiles metil jasmonato y trans-2-hexenal

La aplicación exógena de los compuestos volátiles MeJA y trans-2-hexenal, derivados de la vía de las lipoxigenasas a través de las ramas de AOS y *HPL* respectivamente (Figura 5), induce la acumulación de los mensajeros de los genes *AtLOX2*, *AtLOX3*, *AtLOX6*, AOS y *HPL* (Figuras 11 y 12) con patrones de acumulación diferentes entre ambos tratamientos. El MeJA y el trans-2-hexenal indujeron una acumulación bifásica de los transcritos de los genes *AtLOX2* y AOS,

sin embargo, la acumulación inducida por el MeJA fue tardía respecto a la acumulación inducida por el trans-2-hexenal. No obstante, la acumulación del transcrito de *HPL* en respuesta al MeJA fue más temprana respecto a su acumulación en respuesta al trans-2-hexenal. Por lo tanto, de acuerdo con estos resultados, en respuesta a un estrés como la herida, la planta produciría y percibiría primero al trans-2-hexenal derivado de la rama de la HPL, para inducir la expresión de los genes que participan en la biosíntesis de los jasmonatos. Una vez producidos, estos jasmonatos regularían, además de la expresión de sus genes biosintéticos, la expresión de otros genes, tales como *PDF1.2* y *HPL*, garantizando con la expresión de *HPL*, la producción posterior del trans-2-hexenal, el cual actuaría ahora en conjunto con los jasmonatos en la inducción de la expresión de genes. Se ha demostrado que el cis-3-hexenal, isómero precursor del trans-2-hexenal, se acumula en las hojas de *A. thaliana* en los primeros minutos después de herirlas (Matsui *et al.*, 2000), con lo cual se apoya lo mencionado acerca de la percepción primaria de los compuestos derivados de la HPL (como el trans-2-hexenal) por la planta en respuesta a un estrés. Sin embargo, no se debe olvidar que el MeJA y el trans-2-hexenal se aplicaron exógenamente, involucrando posiblemente procesos de señalización diferentes a los producidos en respuesta a la herida.

Por su parte, el gen *AtLOX6* respondió a la aplicación exógena de los compuestos volátiles MeJA (Figuras 11) y trans-2-hexenal (Figura 12), pero no respondió a los estrés ocasionados por la herida mecánica (Figura 8) y por el hongo fitopatógeno *A. brassicicola* (Figura 13). Este tipo de comportamiento mostrado por *AtLOX6* se ha visto en otras LOXs, como la RCI-1 de *Oryza sativa* (arroz), cuyo transcrito se acumula en respuesta a los inductores químicos de la resistencia adquirida BTH e INA, e inclusive en respuesta a la aplicación exógena del JA, pero no se acumula ni en respuesta a la herida ni en respuesta a la bacteria patógena *Pseudomonas syringae*. (Schaffrath *et al.*, 2000). Por lo cual, queda por definir la función biológica de éstas LOXs en sus respectivas plantas.

Respuesta de los genes de la vía de las lipoxigenasas al hongo necrotrófico *Alternaria brassicicola*

Pennickx *et al.* (1996) encontraron que la infección de plantas silvestres de *A. thaliana* con el hongo necrotrófico *A. brassicicola* induce un aumento gradual en los niveles endógenos del JA, el cual presenta un máximo de acumulación a las 72 horas después de la infección. Consecuentemente, el JA producido en respuesta a *A. brassicicola* induce la expresión del gen *PDF1.2*, el cual codifica para una proteína con propiedades antifúngicas (Penninckx *et al.*, 1998). Como se observa en la Figura 13, los transcritos de los genes *AtLOX2* y *AOS* se acumularon gradualmente en respuesta a *A. brassicicola*, sugiriendo que el incremento en los niveles endógenos del JA en respuesta a dicho hongo podría deberse a un aumento en la expresión de los genes que participan en la biosíntesis de dicho compuesto. Sin embargo, aún cuando los niveles de los mensajeros de *AtLOX2* y *AOS* aumenten y se correlacionen con el incremento en los niveles del ácido

jasmónico endógeno (Penninckx *et al.*, 1996), es posible que la infección con *A. brassicicola* afecte también los niveles de proteína e incluso la actividad de éstas y de otras enzimas. Además, se requiere analizar más a fondo la infección con éste hongo necrotrofico para determinar si las respuestas observadas se deben a las toxinas que produce o a la necrosis que ocasiona.

Por otra parte, nosotros no encontramos acumulación alguna del transcrito de *AtLOX3* en respuesta al hongo necrotrofico *A. brassicicola* (Figura 13), sin embargo, se ha descrito la inducción de éste gen por el hongo biotrofico *Peronospora parasitica* (Mahalingam *et al.*, 2003). Y como se menciona anteriormente, el transcrito de *AtLOX2* se acumula en respuesta a *A. brassicicola* (Figura 13). Por lo tanto, nuestros resultados junto con lo reportado por Mahalingam *et al.* (2003), sugieren una participación diferencial de las LOXs en la respuesta de la planta a los hongos dependiendo si son necrotroficos o biotroficos.

Respecto a *HPL*, no se observa acumulación alguna de su transcrito en las plantas infectadas con *A. brassicicola* (Figura 13), lo cual sugiere que probablemente no se requiere de los derivados de la rama de *HPL* (Figura 5) en la defensa de *A. thaliana* contra dicho hongo.

Como se observa en las Figuras 8-10 y 13, no encontramos acumulación alguna del transcrito de *AtLOX4* ni en respuesta a la herida mecánica ni en respuesta al hongo *A. brassicicola*, lo cual indica que este gen no participa en las respuestas de defensa de *A. thaliana* a dichos estréss. Sin embargo, mediante un análisis de microarreglos con cDNAs se encontró la inducción de *AtLOX4* en respuesta a los estréss ocasionados por sequía, frío y alta salinidad en *A. thaliana* (Seki *et al.*, 2002). Por lo tanto, estudios posteriores sobre la expresión de *AtLOX4* bajo los tratamientos mencionados permitirán la caracterización de éste gen y la determinación de su función en la respuesta de la planta a dichos estréss.

Análisis de las proteínas AtLOX y AOS en respuesta a la herida

Los análisis de la acumulación de las proteínas *AtLOX* y *AOS* realizados mediante Western blot muestran una acumulación constitutiva de ambas proteínas en las plantas silvestres de *A. thaliana* tanto sin herir como heridas (Figura 14), indicando que la planta sintetiza a éstas proteínas como parte de su desarrollo normal. Además, la proteína *AOS* también se acumuló constitutivamente en las plantas con cosupresión de *AtLOX2* tanto sin herir como heridas (Figura 15), lo cual muestra que la presencia constitutiva de *AOS* no se afecta por la falta del JA inducido por la herida.

La proteína *COI1* pertenece a la familia de proteínas con caja F (Xie *et al.*, 1998), las cuales regulan varios procesos en las plantas, tales como la respuesta a auxina (Ruegger *et al.*, 1998) y el desarrollo floral (Ingram *et al.*, 1997), mediante la degradación de proteínas reguladoras. Para el caso específico de *COI1* se ha demostrado que la respuesta de *A. thaliana* al JA depende de ésta proteína

(Devoto *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002). Como se observa en la Figura 16, los resultados obtenidos de las plantas mutantes *coi1-1* muestran una disminución drástica en los niveles de la proteína AOS a la hora después de herir, lo cual indica que se necesita de la proteína COI1 para mantener la acumulación de AOS en la respuesta de defensa de la planta herida. Por lo tanto, de acuerdo con lo anterior, la disminución de AOS en las plantas *coi1-1* heridas (Figura 16) podría deberse a que la falta de COI1 permite la actuación de algún regulador negativo de AOS inducido por la herida.

Haciendo una integración de los resultados obtenidos sobre la acumulación del transcrito (Figuras 8-10) de AOS y de su proteína (Figuras 14-16) en respuesta a la herida mecánica, tal parece que la planta asegura una acumulación constitutiva de la proteína AOS mediante una regulación post-traducciona mediada por la proteína COI1, para así poder responder a la herida mediante la inducción de la actividad de ésta enzima, como lo han demostrado Laudert y Weiler (1998).

Detección inmunológica de las proteínas AtLOX y AOS en extractos de cloroplastos

La detección inmunológica de las proteínas AtLOX y AOS en los extractos de proteínas totales y de cloroplastos (Figura 17) muestra un enriquecimiento de ambas proteínas en los cloroplastos, sobre todo para AOS, la cual se encuentra aproximadamente 15 veces más en los extractos de cloroplastos respecto a las proteínas totales, mientras que para AtLOX se muestra un aumento del 25% aproximadamente. De ésta manera, nuestros resultados demuestran la presencia de la proteína AOS en los cloroplastos de *A. thaliana*. Para el caso de las LOXs, Bell *et al.* (1995) demostraron la localización intracelular de la AtLOX2 en los cloroplastos de chícharo mediante un sistema de transporte *in vitro*, y recientemente, Friso *et al.* (2004) localizaron a esta LOX en el estroma de los cloroplastos de *A. thaliana* mediante un análisis proteómico y espectrometría de masas. Si en efecto, el anticuerpo anti-LOXH1 reconoce a la proteína AtLOX2, como se discute en el apartado de resultados, nuestro resultado sobre la localización de AtLOX en los extractos de cloroplastos de *A. thaliana* se correspondería con el resultado reportado por Friso *et al.* (2004).

CONCLUSIONES

- La expresión del gen *AtLOX2* en la respuesta de defensa de *A. thaliana* a la herida mecánica depende parcialmente de la percepción del JA por la planta. Además, *AtLOX2* participa en la respuesta de defensa de *A. thaliana* al hongo necrotrófico *A. brassicicola*.

- El gen *AtLOX3* participa en la respuesta de defensa de *A. thaliana* a la herida mecánica y su expresión depende parcialmente del JA producido en respuesta a dicho estrés. Además, *AtLOX3* se induce por los compuestos volátiles MeJA y trans-2-hexenal. Sin embargo, *AtLOX3* no participa en la defensa de la planta contra el hongo necrotrófico *A. brassicicola*.

- Los genes *AtLOX4* y *AtLOX6* no participan en las respuestas de defensa de *A. thaliana* a la herida mecánica y al hongo necrotrófico *A. brassicicola*. Sin embargo, mientras que la expresión de *AtLOX6* se induce por los compuestos volátiles MeJA y trans-2-hexenal, el gen *AtLOX4* no se expresa en respuesta a dichos compuestos.

- La expresión del gen *AOS* en respuesta a la herida mecánica es independiente del JA. Sin embargo, la acumulación constitutiva de su proteína depende de COI1 y, por lo tanto, de la percepción del JA por la planta. Además, *AOS* participa en la respuesta de defensa de *A. thaliana* al hongo necrotrófico *A. brassicicola*.

- La expresión del gen *HPL* en la respuesta de defensa de *A. thaliana* a la herida mecánica es dependiente totalmente del JA producido en respuesta a dicho estrés. Además, la expresión de *HPL* se induce por el compuesto volátil trans-2-hexenal. Sin embargo, *HPL* no participa en la defensa de la planta contra el hongo necrotrófico *A. brassicicola*.

- Las proteínas LOX (probablemente *AtLOX2*) y *AOS* se encuentran enriquecidas en los extractos de cloroplastos de *A. thaliana* y se encuentran presentes en las hojas sin herir.

- La acumulación de la proteína *AOS* en las hojas de *A. thaliana* heridas requiere de la proteína con caja F COI1.

PERSPECTIVAS

- Cuantificar los niveles de ácido jasmónico y trans-2-hexenal en las plantas silvestres, cosupresoras de *AtLOX2* y mutantes *coi1-1* de *A. thaliana* a los tiempos determinados después de la herida para establecer si existe una correlación entre la acumulación de éstos compuestos y la acumulación de los transcritos y de las proteínas codificadas por los genes *AOS*, *HPL* y *LOX* de *A. thaliana*.
- Estudiar con mayor detalle la infección (germinación de esporas, liberación de toxinas, necrosis) de las hojas de *A. thaliana* con el hongo *A. brassicicola* para conocer mejor el proceso de infección, así como para determinar si hay una relación entre las etapas de infección y la acumulación de los transcritos y de las proteínas codificadas por los genes *AOS*, *HPL* y *LOX* de *A. thaliana*.
- Determinar la especificidad del anticuerpo anti-LOXH1 de *S. tuberosum* para verificar a cual de las cuatro LOXs de *A. thaliana* con péptido de tránsito hacia el cloroplasto reconoce.
- Encontrar la proteína reconocida por COI1 que debe ser destruida para mantener la acumulación de la proteína AOS en las hojas de *A. thaliana* en respuesta a la herida.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal AA** (2000) Mechanisms, ecological consequences and agricultural implications of tri-trophic interactions. *Curr Opin Plant Biol* 3: 329-335
- Alborn HT, Turlings TCJ, Jones TH, Stenhagen G, Loughrin JH y Tumlinson JH** (1997) An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. *Science* 276: 945-949
- Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815
- Arimura G, Ozawa R, Shimoda T, Nishioka T, Boland W y Takabayashi J** (2000) Herbivory-induced volatiles elicit defense genes in lima bean leaves. *Nature* 406: 512-515
- Bate NJ y Rothstein SJ** (1998) C₆-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. *Plant J* 16: 561-569
- Bate NJ, Sivasankar S, Moxon C, Riley JM, Thompson JE y Rothstein SJ** (1998) Molecular characterization of an *Arabidopsis* gene encoding hydroperoxide lyase, a cytochrome P-450 that is wound inducible. *Plant Physiol* 117: 1393-1400
- Bell E y Mullet J** (1993) Characterization of an *Arabidopsis* lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiol* 103: 1133-1137
- Bell E, Creelman RA y Mullet JE** (1995) A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Science USA* 92: 8675-8679
- Blée E y Joyard J** (1996) Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Plant Physiol* 110: 445-454
- Boyington JC, Gaffney BJ y Amzel LM** (1993) The three-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase. *Science* 260: 1482-1486
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Brown TA** (1991) Molecular biology labfax. Bios Scientific Publishers, Manchester, UK, pp. 88
- Broekaert WF, Cammue BPA, De Bolle MFC, Thevissen K, De Samblanx GW y Osborn RW** (1997) Antimicrobial peptides from plants. *Crit Rev Plant Sci* 16: 297-323
- Burow GB, Gardner HW y Keller NP** (2000) A peanut seed lipoxygenase responsive to *Aspergillus* colonization. *Plant Mol Biol* 42: 689-701
- Chapple C** (1998) Molecular-genetic analysis of plant cytochrome p450-dependent monooxygenases. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 311-343
- Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ y Rutter WJ** (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18:5294-5299.
- Conconi A, Miquel M, Browse JA y Ryan CA** (1996) Intracellular levels of free linolenic and linoleic acids increase in tomato leaves in response to wounding. *Plant Physiol* 111: 797-803
- Creelman RA, Tierney ML y Mullet JE** (1992) Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proc Natl Acad Science USA* 89: 4938-4941
- Creelman RA y Mullet JE** (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 355-381
- Creelman RA y Rao MV** (2002) The oxylipin pathway in *Arabidopsis*. The *Arabidopsis* Book. American Society of Plant Biologists, pp. 1-24

- Croft KPC, Juttner F y Slusarenko AJ** (1993) Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Physiol* 101: 13-24
- Croteau R, Kutchan TM y Lewis NG** (2000) Natural products (secondary metabolites). En: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Buchanan B, Gruissem W y Jones R. American society of plant physiologists, Rockville, MD, USA, pp. 1250-1318
- Devoto A, Nieto-Rostro M, Xie D, Ellis C, Harmston R, Patrick E, Davis J, Sherratt L, Coleman M y Turner JG** (2002) COI1 links jasmonate signaling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in *Arabidopsis*. *Plant J* 32: 457-466
- Devoto A y Turner JG** (2003) Regulation of jasmonate-mediated plant responses in *Arabidopsis*. *Ann Bot* 92: 329-337
- Dixon RA** (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411: 843-847
- Doares SH, Syrovets T, Weiler EW y Ryan CA** (1995) Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive gene through the octadecanoid pathway. *Proc Natl Acad Science USA* 92: 4095-4098
- Dubbs WE y Grimes HD** (2000) Specific lipoxygenase isoforms accumulate in distinct regions of soybean pod walls and mark a unique cell layer. *Plant Physiol* 123: 1269-1279
- Farmer EE y Ryan CA** (1992) Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* 4: 129-134
- Farmer EE** (1994) Fatty acid signaling in plants and their associated microorganisms. *Plant Mol Biol* 26: 1423-1437
- Farmer EE** (2001) Surface-to-air signals. *Nature* 411: 854-856
- Feussner I, Hause B, Vörös K, Parthier B y Waternack C** (1995) Jasmonate-induced lipoxygenase forms are localized in chloroplasts of barley leaves (*Hordeum vulgare* cv *Salome*). *Plant J* 7: 949-957
- Feussner I, Bachmann A, Höhne M y Kindl H** (1998) All three acyl moieties of trilinolein are efficiently oxygenated by recombinant His-tagged lipid body lipoxygenase *in vitro*. *FEBS Lett* 431: 433-436
- Feussner I, Kühn H y Waternack C** (2001) The lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends Plant Sci* 6: 262-267
- Feussner I y Waternack C** (2002) The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol* 53: 275-297
- Feys BJB, Benedetti CE, Penfold CN y 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
- Fischer AM, Dubbs WE, Baker RA, Fuller MA, Stephenson LC y Grimes HD** (1999) Protein dynamics, activity and cellular localization of soybean lipoxygenases indicate distinct functional roles for individual isoforms. *Plant J* 19: 543-554
- Friso G, Giacomelli L, Ytterberg AJ, Peltier JB, Rudella A, Sun Q y van Wijk KJ** (2004) In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database. *Plant Cell* 16: 478-499
- Froehlich JE, Itoh A y Howe GA** (2001) Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelope. *Plant Physiol* 125: 306-317
- Gomi K, Yamasaki Y, Yamamoto H y Akimitsu K** (2003) Characterization of a hydroperoxide lyase gene and effect of C₆-volatiles on expression of genes of the oxylipin metabolism in Citrus. *J Plant Physiol* 160: 1219-1231
- Hammond-Kosack K y Jones JDG** (2000) Responses to plant pathogens. En: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Buchanan B, Gruissem W y Jones R. American society of plant physiologists, Rockville, MD, USA, pp. 1102-1156

- Ingram GC, Doyle S, Carpenter R, Schultz EA, Simon R y Coen ES (1997) Dual role for fimbriata in regulating floral homeotic genes and cell division in *Antirrhinum*. *EMBO J* 16: 6521-6534
- Ishiguro A, Kawai-Oda A, Ueda J, Nishida I y Okada K (2001) The Defective in Anther Dehiscence1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 2191-2209
- Joyard J y Douce R (1979) Characterization of phosphatidate phosphohydrolase activity associated with chloroplast envelope membranes. *FEBS Lett.* 1:147-50
- Kessler A y Baldwin IT (2001) Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* 291: 2141-2144
- Kessler A y Baldwin IT (2002) Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. *Annu Rev Plant Biol* 53: 299-328
- Kolomiets MV, Hannapel DJ, Chen H, Tymeson M y Gladon RJ (2001) Lipoxygenase is involved in the control of potato tuber development. *Plant Cell* 13: 613-626
- Kubigsteltig I, Laudert D y Weiler EW (1999) Structure and regulation of the *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase gene. *Planta* 208: 463-471
- Laudert D, Pfannschmidt U, Lottspeich F, Hollander-Czytko H y Weiler EW (1996) Cloning, molecular and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase (CYP 74) , the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmoantes. *Plant Mol Biol* 31: 323-335
- Laudert D y Weiler EW (1998) Allene oxide synthase: A major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signaling. *Plant J* 15: 675-684
- Laudert D, Schaller F y Weiler EW (2000) Transgenic *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing allene oxide synthase. *Planta* 211: 163-165
- Mahalingman R, Gomez-Buitrago AM, Eckardt N, Shah N, Guevara-Garcia A, Day P, Raina R y Fedoroff NV (2003) Characterizing the stress/defense transcriptome of *Arabidopsis*. *Genome Biol* 4, R20
- Matsui K, Irie M, Kajiwara T y Hatanaka A (1992) Developmental changes in lipoxygenase activity in cotyledons of cucumber seedlings. *Plant Sci* 85: 23-32
- Matsui K, Nishioka M, Ikeyoshi M, Matsumara Y, Mori T y Kajiwara T (1998) Cucumber root lipoxygenase can act on acyl groups in phosphatidylcholine. *Biochem Biophys Acta* 1390: 8-20
- Matsui K, Hijiya K, Tabuchi Y y Kajiwara T (1999) Cucumber cotyledon lipoxygenase during postgerminative growth. Its expression and action on lipid bodies. *Plant Physiol* 119: 1279-1287
- Matsui K, Wilkinson J, Hiatt B, Knauf V y Kajiwara T (1999) Molecular cloning and expression of *Arabidopsis* fatty acid hydroperoxide lyase . *Plant Cell Physiol* 40: 477-481.
- Matsui K, Kurishita S, Hisamitsu A y Kajiwara T (2000) A lipid-hydrolysing activity involved in hexenal formation. Biochemical Society. Lipids and Signaling: Oxylipins 2, pp. 857-860
- May C, Höhne M, Gnau P, Schwennesen K y Kindl H (2000) The N-terminal β -barrel structure of lipid body lipoxygenase mediates its binding to liposomes and lipid bodies. *Eur J Biochem* 267: 1100-1109
- McConn M, Creelman RA, Bell E, Mullet JE y Browse J (1997) Jasmonate plays an essential role in plant insect defense. *Proc Natl Acad Science USA* 94: 5473-5477
- Melan M, Dong X, Endara M, Davis K, Ausubel F y Peterman T (1993) An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. *Plant Physiol* 101: 441-450

- Narvaez-Vasquez J, Florin-Christensen J y Ryan CA** (1999) Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, systemin, and oligosaccharide in tomato leaves. *Plant Cell* 11: 2249-2260
- Nelson D, Lasswell J, Rogg L, Cohen M y Bartle B** (2000) FKF1, a clock-controlled gene that regulates the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Cell* 101: 331-340
- Noordermeer M, Veldink G y Vliegenthart J** (2001) Fatty acid hydroperoxide lyase: A plant cytochrome P450 enzyme involved in wound healing and pest resistance. *ChemBiochem* 2: 494-504
- Park JH, Halitschke R, Kim HB, Baldwin IT, Feldmann KA y Feyereisen R** (2002) A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *Plant J* 31: 1-12
- Penninckx IA, Eggermont K, Terras FR, Thomma B, De Samblanx GW, Buchala A, Métraux JP, Manners JM y Broekaert WF** (1996) Pathogen-Induced Systemic Activation of a Plant Defensin Gene in *Arabidopsis* Follows a Salicylic Acid-Independent Pathway. *Plant Cell* 8: 2309-2323
- Penninckx IA, Thomma BP, Buchala A, Métraux JP y 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
- Peña-Cortes H, Fisahn J y Willmitzer L** (1995) Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. *Proc Natl Acad Science USA* 92: 4106-4113
- Porta H, Rueda-Benítez P, Campos F, Colmenero-Flores JM, Colorado JM, Carmona MJ, Covarrubias AA y Rocha-Sosa M** (1999) Analysis of lipoxygenase mRNA accumulation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during development and under stress conditions. *Plant Cell Physiol* 40: 850-858
- Porta H y Rocha-Sosa M** (2000) A *Phaseolus vulgaris* lipoxygenase gene expressed in nodules and in *Rhizobium tropici* inoculated roots. *Biochim Biophys Acta* 91480: 1-4
- Porta H y Rocha-Sosa M** (2002) Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiol* 130: 15-21
- Royo J, Vancanneyt G, Perez AG, Sanz C, Störmann K, Rosahl S y Sánchez-Serrano J** (1996) Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. *J Biol Chem* 271: 21012-21019
- Royo J, León J, Vancanneyt G, Albar J, Rosahl S, Ortego F, Castañera P y Sánchez-Serrano J** (1999) Antisense-mediated depletion of a potato lipoxygenase reduces wound induction of proteinase inhibitors and increases weight gain of insect pests. *Proc Natl Acad Science USA* 96: 1146-1151
- Ruegger M, Dewey E, Gray WM, Hobbie L, Turner J y Estelle M** (1998) The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes Dev* 12: 198-207
- Saghai-Marouf MA, Soliman KM, Jorgensen RA y Allard RW** (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Science USA* 81:8014-8018
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T** (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schaffrath U, Zabbai F y Dudler R** (2000) Characterization of RCI-1, a chloroplastic rice lipoxygenase whose synthesis is induced by chemical plant resistance activators. *Eur J Biochem* 267: 5935-5942
- Schaller F** (2001) Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signaling molecules. *J Exp Bot* 52: 11-23

- Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, et al.** (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J* 31: 279-292
- Seo HS, Song JT, Cheong JJ, Lee YH, Lee YW, Hwang I, Lee JS y Choi YD** (2001) Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc Natl Acad Science USA* 98: 4788-4793
- Siedow JN** (1991) Plant lipoxygenase – structure and function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42: 145-188
- Stelmach BA, Müller A, Hennig P, Gebhardt S, Schubert-Zsilavec M y Weiler EW** (2001) A novel class of oxylipins, *sn1-O*-(12-oxophytodienoyl)-*sn2-O*-(hexadecatrienoyl)-monogalactosyl diglyceride, from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 276: 12832-12838
- Stenzel I, Hause B, Miersch O, Kurz T, Maucher H, Weichert H, Ziegler J, Feussner I y Wasternack C** (2003) Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 51: 895-911
- Stintzi A, Weber H, Reymond P, Browse J y Farmer EE** (2001) Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones. *PNAS USA* 98: 12837-12842
- Thaler J** (1999) Jasmonate-inducible plant defenses cause increased parasitism of herbivores. *Nature* 399: 686-688
- Thomma BPHJ, Eggermont K, Penninckx IAMA, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue BPA y Broekaert WF** (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc Natl Acad Science USA* 95: 15107-15111
- Tranbarger TJ, Franceschi VR, Hildebrand DF y Grimes HD** (1991) The soybean 94-kilodalton vegetative storage protein is a lipoxygenase that is localized in paraveinal mesophyll cell vacuoles. *Plant Cell* 3: 973-987
- Turner JG, Ellis C y Devoto A** (2002) The jasmonate signal pathway. *Plant Cell*, S153-S164
- Wang C, Zien C, Afithile M, Welti R, Hildebrand DF y Wang X** (2000) Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 2237-2246
- Weber H, Vick BA y Farmer EE** (1997) Dinor-oxo-phytodienoic acid: a new hexadecanoid signal in the jasmonate. *Proc Natl Acad Science USA* 94: 10473-10478
- Weber H, Chételat A, Caldelari D y Farmer EE** (1999) Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves. *Plant Cell* 11: 485-493
- Weber H** (2002) Fatty acid-derived signals in plants. *Trends Plant Sci* 7: 217-224
- Wink M** (2003) Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64: 3-19
- Xie DX, Feys BF, James S, Nieto-Rostro M y 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 y Xie D** (2002) The SCF^{COI1} ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 1919-1935

APÉNDICE

MEDIOS Y SOLUCIONES

Buffer Bradford:

Etanol 95%	100 ml
Ácido fosfórico 88%	200 ml
Serva Blue G	350 mg

Buffer CTAB 2X:

Tris/Cl pH 8.0	100 mM
NaCl	1.4 M
EDTA	20 mM
Bromuro de hexadeciltrimetil amonio	2% (w/v)
Mercaptoetanol	0.2% (w/v)

Buffer de carga (RNA) (5 ml):

MOPS (10X)	500 μ l
Formaldehído	875 μ l
Formamida	2.5 ml
Colorante de carga	500 μ l
Bromuro de etidio (10 mg/ml)	13 μ l
H ₂ O destilada estéril	612 μ l

Buffer de corrida 1X (3 L):

Trisma base	9 g
Glicina	43.2 g
SDS al 10%	30 ml

Buffer de prehibridación (10 ml):

Fosfato sódico 1 M pH 7.2	3 ml
SDS 10%	7 ml
EDTA 0.5 M	20 μ l

Buffer de transferencia (1 L):

Trisma base	3 g
Glicina	14.4 g
Metanol	200 ml

Buffer Laemmli 2X:

Tris HCl pH 6.8	100 mM
Ditiotreitol	200 mM
SDS	4% (w/v)
Azul de bromofenol	0.2% (w/v)
Glicerol	20% (w/v)

Buffer PSE:

Fosfato sódico pH 7.2	0.3 M
SDS	7% (w/v)
EDTA	1mM

Buffer TAE 50X:

Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57.1 ml
EDTA 0.5 M pH 8.0	100 ml

Buffer TE:

Tris/HCl pH 8.0	10 mM
EDTA pH 8.0	1 mM

Colorante de carga (RNA) (1 ml):

Glicerol	500 µl
Azul de bromofenol (1%)	250 µl
H ₂ O destilada estéril	250 µl

MOPS 10X (1 L):

MOPS	41.86 g
Na ₂ Ac	4.1 g
EDTA 0.5 M pH 8.0	20 ml

PBS 1X pH 7.4 (1 L):

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g

Ponceau S (100 ml):

Ponceau S	2 g
Ácido tricloroacético	30 g
Ácido sulfosalisílico	30 g

SSC 20X:

NaCl	3 M
Citrato trisódico pH 7.0	0.3 M

Vitaminas B5 (stock de 10 ml):

Mio-inositol	1 g
Tiamina HCl	0.1 g
Piridoxina HCl	10 mg
Ácido nicotínico	10 mg