

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD IRAPUATO



**El gen *BOL* como posible modulador de la vía de
jasmonatos en plantas vasculares**

TESIS QUE PRESENTA

LGA Beatriz Esperanza Ruiz Cortés

PARA OBTENER EL GRADO DE

Maestra en Ciencias

EN LA ESPECIALIDAD DE

Biología de Plantas

DIRECTORA DE LA TESIS: Dra. Nayelli Marsch Martínez

Irapuato, Guanajuato

9 de Julio, 2018

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo otorgado para la realización de mi posgrado con la beca número 587886.

Al CINVESTAV Unidad Irapuato, por haber sido la institución que me ayudó a realizar mi posgrado.

A la Dra. Nayelli Marsch Martínez, por haber aceptado ser mi mentora y haber sido fuente de inspiración, por sus grandes consejos y paciencia durante estos años, sin sus aportaciones al mundo de la ciencia, este trabajo no habría sido posible.

Al grupo del laboratorio de Identidad Celular, Juan Carlos Ochoa, David Díaz, Yolanda Durán, Ury Díaz, y Hugo Lazcano, por el apoyo académico y emocional que me brindaron durante la realización de este trabajo.

Al grupo del laboratorio del Dr. Stefan de Folter, por la ayuda que me otorgaron durante este trabajo.

A Omar Hernández del laboratorio del Dr. Martin Heil, por su colaboración con el experimento de la cuantificación de ácido jasmónico.

A los chicos que estuvieron de estancia en el laboratorio, Fátima Tornero, Ricardo Santís y Leandro Alcocer, por la ayuda brindada en los experimentos de esta tesis.

Al personal administrativo de CINVESTAV Irapuato, Dora, Diana y Juan Pablo.

DEDICATORIA

A mis padres Beatriz Cortés Leyva y Roberto Ruiz Gómez, por ser mi ejemplo de vida, por creer siempre en mí y por apoyarme incondicionalmente en todo, todos mis logros son gracias a ellos.

A mi hermano Roberto Esteban Ruiz Cortés, por ser una de las fuerzas que me hicieron creer en mí misma y siempre salir adelante.

A mi familia, mis abuelos, mis tíos y primos, por estar en todo momento a mi lado animándome a cumplir mis metas.

A mis suegros Roberto y Graciela, por ser mi segunda familia y por ayudarme siempre con las dificultades que se presentan en la vida.

A los amigos que hice en Irapuato, Paulina, Elsa, Mayté, Paul, Fernando, Vincent, Tona, Kary, Karla, Yola, David y Ury, por todo su apoyo, todos los buenos momentos que hemos vivido juntos y todos los que nos faltan por vivir.

A mis mejores amigos, Nayeli Cárdenas Barajas y Sergio González Vargas, por ser mis confidentes, mi fuerza, mi apoyo en tiempos difíciles y por motivarme a alcanzar mis metas.

A mi esposo Joel, por ser mi fuerza todos los días, por motivarme a seguir adelante y ayudarme a cumplir mis sueños, por ser mi mejor amigo y un gran esposo.

A todos ustedes, muchas gracias, este trabajo no habría sido posible sin todo su apoyo.

RESUMEN

El ácido jasmónico (JA) y sus derivados, comúnmente conocidos como jasmonatos, son hormonas vegetales que se han estudiado principalmente como señales en la respuesta al estrés en las plantas y recientemente en los procesos de desarrollo. Estas respuestas son el resultado de una cascada de señalización que involucra factores de transcripción que modulan la expresión de genes. BOLITA (BOL) es un factor de transcripción cuya sobreexpresión en *Arabidopsis* causa la reducción del tamaño de la planta y la formación de callos ectópicos en las raíces, mientras que la pérdida de función de la mutante presenta una alteración en la formación de los órganos florales. Un estudio transcriptómico reciente mostró que varios genes implicados en la vía biosintética y de señalización de jasmonatos tienen una expresión diferencial entre las plantas que sobreexpresan BOL y las plantas silvestres (WT). Además, los niveles de JA se han comparado en plantas que sobreexpresan *BOL* y plantas silvestres, y se observó un incremento de 2 veces en *Arabidopsis* y un aumento de 6 veces en plantas de tabaco. Con esta evidencia y el hecho de que los jasmonatos causan una reducción de la planta de tamaño que se asemeja a los fenotipos de los sobreexpresores de *BOL*, hipotetizamos que BOL podría estar involucrado en la vía del JA. Para probar esta hipótesis, empleamos una línea inducible de *BOL* para monitorear cambios en la expresión de genes de jasmonatos y el aumento en el nivel de JA en diferentes momentos después de la inducción de *BOL*, así como observaciones fenotípicas de mutantes de *BOL* con aplicación ectópica de JA y la evaluación de la respuesta de *BOL* a perturbaciones en la ruta de JA. Se encontró que el gen *JAZ8* está sobreexpresado a tiempos cortos de la inducción de *BOL*, pero está reprimido a tiempos largos en plantas que presentan ganancia de función de *BOL*. Se observó también que las raíces de plantas silvestres tratadas con MeJA tenían una longitud similar a las plantas sobreexpresantes de *BOL*, además de que ésta última parece ser más responsiva a jasmonatos que la planta silvestre, al contrario de la mutante de pérdida de función que fue menos responsiva. La aplicación exógena de JA a inflorescencias de mutantes de pérdida de función de *BOL* permitió una recuperación parcial del fenotipo, sugiriendo que el fenotipo alterado podría deberse parcialmente a una

disminución del contenido de JA. Además, después de inducir la actividad de *BOL* se pudo observar un aumento de la acumulación de ácido jasmónico. Por otro lado, la inhibición de la síntesis de jasmonatos provocó una expansión del dominio de expresión de *BOL* y una expresión ectópica. Estos resultados demuestran que al menos una parte de las funciones de *BOL* está relacionada con la ruta de jasmonatos. Parece existir retroalimentación entre el factor de transcripción y la ruta de jasmonatos, ya que perturbaciones en el factor afectan a la ruta, y perturbaciones en la ruta también afectan la expresión del factor de transcripción. Más experimentos en el futuro permitirán aclarar la naturaleza de esta relación.

ABSTRACT

Jasmonic acid (JA) and its derivatives, commonly known as jasmonates, are plant hormones that have been mostly studied as signals that participate in the stress response in plants and recently also in developmental processes. These responses are the result of a signaling cascade, involving transcription factors that modulate the expression of genes. BOLITA (*BOL*) is a transcription factor whose overexpression in *Arabidopsis* causes the reduction of the plant size and ectopic callus formation in roots, whereas the loss-of-function mutant presents an alteration in the formation of the floral organs. A recent transcriptomic study showed that several genes involved in the jasmonate biosynthetic and signaling pathway have a differential expression between wild type (WT) and *BOL* overexpressing plants. Also, the levels of JA have been compared in plants that overexpress *BOL* and WT, and a 2-fold increase in *Arabidopsis* and a 6-fold increase in tobacco *BOL* overexpressing plants was observed. With this evidence and the fact that jasmonates cause a reduction of the size plant resembling the phenotypes of *BOL* overexpressors, we hypothesize that *BOL* might be connected to the JA pathway. To test this hypothesis, we employed a *BOL* inducible line to monitor changes in the expression of jasmonate genes and the increase in JA level at different times after *BOL* induction. We also performed phenotypic evaluations of *BOL* mutants comparing mock or ectopic application of JA, and analyzed the changes in *BOL* expression to disturbances in the route of JA. We found that the *JAZ8* gene is overexpressed at short times of *BOL* induction but is repressed when *BOL* is constitutively expressed. We also observed that the roots of wild plants treated with MeJA had a similar length to the *BOL* overexpressing plants, and that the latter were more responsive to JA than wild type plants, in contrast to the loss-of-function mutant that was less responsive. The exogenous application of JA to inflorescences of *BOL* loss-of-function mutants allowed a partial recovery of their flower phenotype, suggesting that the altered phenotype could be partially due to a decrease in the content of JA. In addition, after inducing the activity of *BOL*, an increase in the accumulation of jasmonic acid was observed. On the other hand, the inhibition of synthesis of jasmonates caused an expansion of the expression domain of *BOL* and

its ectopic expression. These results indicate that at least part of the BOL functions is related to the jasmonate route. There seems to exist feedback between the transcription factor and the jasmonate pathway, because perturbations that affect the factor also affect the pathway, and perturbations in the pathway also affect the expression of the transcription factor. More experiments will allow to further understand the nature of this relationship.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Jasmonatos.....	1
1.1.1. Biosíntesis de jasmonatos.....	1
1.1.2. Derivados del ácido jasmónico.....	3
1.1.3. Percepción y señalización de jasmonatos.....	5
1.1.4. Actividad biológica de los jasmonatos.....	6
1.1.4.1. Respuesta al estrés.....	6
1.1.4.2. Regulación del desarrollo de la planta.....	7
1.1.5. Reguladores transcripcionales de la ruta de jasmonatos...9	
2. ANTECEDENTES.....	10
2.1. El gen <i>BOLITA</i>	10
2.1.1. Patrón de expresión de <i>BOL</i>	10
2.1.2. Mutante <i>bol-D</i>	12
2.1.3. Sobre expresión de <i>BOL</i> en tabaco.....	13
2.1.4. Mutante <i>drnl-2</i>	15
2.2. Posible relación entre el gen <i>BOL</i> y la ruta de JA.....	16
2.3. Expresión diferencial de genes en mutantes del gen <i>BOL</i>	17
2.3.1. Microarreglo.....	17
2.3.2. Transcriptoma.....	18
3. HIPÓTESIS.....	21

4. OBJETIVOS.....	21
4.1. Objetivo general.....	21
4.2. Objetivos específicos.....	21
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
5.1. Material vegetal.....	22
5.2. Condiciones de crecimiento.....	23
5.2.1. Crecimiento <i>in vitro</i>	23
5.2.2. Crecimiento en invernadero.....	24
5.3. Tinción histológica con GUS.....	24
5.4. Transformación de la línea <i>Jas9-VENUS</i>	25
5.5. RT-PCR de genes de la ruta de los jasmonatos.....	27
5.6. Evaluación fenotípica entre plantas <i>bol-D</i> y plantas silvestres tratadas con MeJA.....	27
5.7. Comparación de los fenotipos de órganos florales entre plantas <i>drnl-2</i> y plantas mutantes de genes de la ruta de los jasmonatos.....	28
5.8. Expresión de <i>BOL</i> en respuesta a la inhibición de síntesis de JA....	28
5.9. Aplicación de MeJA a plantas <i>drnl-2</i>	29
5.10. Cuantificación de los niveles de jasmonatos en plantas inducibles de la actividad de <i>BOL</i>	29
5.11. Cruzas con líneas marcadoras de jasmonatos y mutantes de genes de la ruta de los jasmonatos.....	30
5.12. Expresión transitoria de <i>BOL</i> en línea marcadora de jasmonatos en jitomate.....	31

5.13. Análisis de expresión del gen <i>JAZ8</i> en la mutante <i>jaz8</i>	32
5.14. Análisis estadísticos.....	32
6. RESULTADOS.....	33
6.1. OBJETIVO 1. Verificar el cambio en la expresión de los genes de JA en las mutantes de <i>BOL</i>	33
6.2. OBJETIVO 2. Comparar los fenotipos de las mutantes de <i>BOL</i> y JA y los tratamientos con MeJA, en las mismas condiciones y tiempos de desarrollo.....	34
6.2.1. Evaluación fenotípica de plantas <i>bol-D</i> , <i>drnl-2</i> y plantas silvestres tratadas con MeJA.....	35
6.2.2. Comparación de los fenotipos de órganos florales entre plantas <i>drnl-2</i> y plantas mutantes de genes de la ruta de los jasmonatos.....	39
6.3. OBJETIVO 3. Evaluar si la aplicación exógena de JA complementa el fenotipo alterado de la mutante de pérdida de función.....	40
6.4. OBJETIVO 4. Conocer si el nivel de jasmonatos está afectado en plantas donde se induce la actividad de <i>BOL</i>	44
6.5. OBJETIVO 5. Evaluar la respuesta del gen <i>BOL</i> a perturbaciones en la ruta de JA.....	46
6.6. OBJETIVO 6. Evaluar el cambio en la expresión de líneas marcadoras de JA al inducir, aumentar o reducir la expresión del gen <i>BOL</i>	51
6.6.1. Expresión transitoria de <i>BOL</i> en línea marcadora de jasmonatos en jitomate.....	51
6.6.2. Cruzas con líneas marcadoras de jasmonatos.....	52

6.6.3. Transformación de la línea <i>Jas9-VENUS</i>	53
6.7. OBJETIVO 7. Obtener material necesario para posteriores evaluaciones de interacciones genéticas entre mutantes afectadas en la ruta de JA y mutantes de <i>BOL</i>	55
6.7.1. Genotipificación de mutante <i>jaz8</i>	55
6.7.2. Cruzas con plantas mutantes de genes de la ruta de los jasmonatos.....	56
7. DISCUSIÓN.....	57
7.1. Cambio en la expresión de genes de JA en las mutantes de <i>BOL</i>	57
7.2. Evaluación fenotípica de plantas <i>bol-D</i> y plantas silvestres tratadas con MeJA.....	59
7.3. Comparación de los fenotipos de órganos florales entre plantas <i>drnl-2</i> y plantas mutantes de la ruta de los jasmonatos.....	61
7.4. Efecto de la aplicación exógena de MeJA en el fenotipo de la mutante de pérdida de función de <i>BOL</i>	61
7.5. Nivel de jasmonatos en plantas donde se induce la actividad de <i>BOL</i>	63
7.6. Respuesta del gen <i>BOL</i> a perturbaciones en la ruta de JA.....	64
7.7. Cambio en la expresión de líneas marcadoras de JA al inducir, aumentar o reducir la expresión del gen <i>BOL</i>	65
7.7.1. Expresión transitoria de <i>BOL</i> en línea marcadora de jasmonatos en jitomate.....	65
7.8 Relación de <i>BOL</i> con la ruta de jasmonatos.....	66
8. CONCLUSIONES.....	68

9. REFERENCIAS.....71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Biosíntesis de jasmonatos.....	3
Figura 2. Metabolitos producidos a partir del ácido jasmónico.....	4
Figura 3. Percepción de jasmonatos y señalización de genes responsivos a jasmonatos.....	5
Figura 4. Patrón de expresión de <i>BOL</i>	11
Figura 5. Fenotipo de la mutante <i>bol-D</i>	12
Figura 6. Fenotipo de flores y silicuas de plantas <i>bol-D</i>	13
Figura 7. Fenotipo de plantas de tabaco <i>35S-BOL</i>	14
Figura 8. Flores mutantes <i>drnl-2</i>	16
Figura 9. RT-PCR de genes de jasmonatos en mutantes de <i>BOL</i>	34
Figura 10. Longitud de raíces de 9, 13 y 19 ddg de las líneas <i>bol-D</i> , <i>Ws-wt</i> , <i>drnl-2</i> y <i>Ler-wt</i> con 50 μ M de MeJA y sin hormona.....	36
Figura 11. Diámetro de rosetas de 14 ddg de las líneas <i>bol-D</i> y <i>Ws-wt</i> con 50 μ M de MeJA y sin hormona.....	37
Figura 12. Rosetas de plantas <i>bol-D</i> y <i>Ws-wt</i> con 50 μ M de MeJA y sin hormona.....	38
Figura 13. Comparación de los fenotipos de flores de plantas mutantes en genes de jasmonatos y la mutante de pérdida de función de <i>BOL</i> (<i>drnl-2</i>).....	39
Figura 14. Número de pétalos, filamentos y estambres de plantas <i>drnl-2</i> después de 2 y 8 días de aplicación de MeJA.....	41
Figura 15. Número de pétalos de flores <i>drnl-2</i> abiertas durante 7 días después de la aplicación de 50 y 500 μ M de MeJA por 2 y 8 días.....	42

Figura 16. Número de filamentos de flores <i>drnl-2</i> abiertas durante 7 días después de la aplicación de 50 y 500 μ M de MeJA por 2 y 8 días.....	43
Figura 17. Número de estambres de flores <i>drnl-2</i> abiertas durante 7 días después de la aplicación de 50 y 500 μ M de MeJA por 2 y 8 días.....	44
Figura 18. Concentración de ácido jasmónico (ng de ácido jasmónico por gramo de peso fresco) en plantas silvestres e inducibles de <i>BOL (35S-ESR2-ER)</i> con y sin inductor (DMSO).....	46
Figura 19. Expresión de <i>BOL</i> en raíces secundarias a las 24 horas de exposición a DIECA.....	47
Figura 20. Expresión de <i>BOL</i> en raíces secundarias a las 48 horas de exposición a DIECA.....	48
Figura 21. Expresión de <i>BOL</i> en raíces secundarias a las 72 horas de exposición a DIECA.....	48
Figura 22. Expresión de <i>BOL</i> en la raíz principal a las 24 horas de exposición a DIECA.....	49
Figura 23. Expresión de <i>BOL</i> en la raíz principal a las 48 horas de exposición a DIECA.....	50
Figura 24. Expresión de <i>BOL</i> en la raíz principal a las 72 horas de exposición a DIECA.....	50
Figura 25. Expresión en línea marcadora <i>JERE-GUS</i> de jitomate tres días después de la agroinfiltración.....	52
Figura 26. Líneas transformantes <i>Jas9-VENUS</i>	54
Figura 27. RT-PCR para <i>JAZ8</i> en mutante <i>jaz8</i>	55
Figura 28. Expresión del gen <i>JAZ8</i> en plantas silvestres tratadas con MeJA.....	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genes relacionados con jasmonatos con un cambio en la expresión en el microarreglo de Marsch-Martínez <i>et-al.</i> (2006).....	18
Tabla 2. Genes relacionados con jasmonatos con un cambio en su expresión a los 30 minutos después de la inducción de BOL en el transcriptoma.....	19
Tabla 3. Genes relacionados con jasmonatos con un cambio en su expresión a las 8 horas después de la inducción de BOL en el transcriptoma.....	19
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para realizar RT-PCR.....	27
Tabla 5. Cruzas de plantas mutantes de <i>BOL</i> con líneas marcadoras de jasmonatos y mutantes de genes de la ruta de jasmonatos.....	31
Tabla 6. Cruzas de plantas mutantes de <i>BOL</i> con líneas marcadoras de jasmonatos.....	53
Tabla 7. Cruzas de plantas mutantes de <i>BOL</i> con mutantes de genes de la ruta de jasmonatos.....	56

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Jasmonatos

El ácido jasmónico (JA) y sus derivados, a los que comúnmente se les conoce como jasmonatos, son metabolitos derivados de lípidos del grupo de las oxilipinas que tienen un papel en las plantas como señales en las respuestas al estrés y en procesos de desarrollo (Kombrink, 2012). Estas hormonas vegetales pueden regular procesos como la maduración del fruto, crecimiento de la raíz, producción de polen viable y la resistencia de las plantas a patógenos e insectos, además de respuestas al estrés por ozono, luz ultravioleta y daño mecánico (Creelman y Mullet, 1997; Wasternack, 2007). Los jasmonatos están presentes a través de toda la planta, encontrándose las mayores concentraciones en tejidos en crecimiento como el ápice del brote, las puntas de las raíces, frutos inmaduros y hojas jóvenes (Piotrowska y Bajguz, 2011).

1.1.1. Biosíntesis de jasmonatos

Las oxilipinas son generadas en la ruta de lipoxigenasa, a partir del ácido α -linolénico (18:3) que se libera de las membranas del cloroplasto (Wasternack, 2007). El ácido α -linolénico es oxidado por la enzima 13-lipoxigenasa (LOX) a ácido 13-(S)-hidroperoxi-octadecatrienoico (13-HPOT), más específicamente la enzima LOX2, que se encuentra en cloroplasto, es la encargada de llevar a cabo este paso (Bell *et al.*, 1995). Posteriormente el 13-HPOT puede ser metabolizado a diferentes clases de oxilipinas (Kombrink, 2012), pero uno de los pasos clave de la biosíntesis de JA es que el 13-HPOT sirve como sustrato para la enzima aleno-óxido sintasa (AOS), que es deshidratado para formar un compuesto inestable llamado ácido 12-13-epoxioctadecatrienóico (12,13-EOT) (Park *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2013), que después es ciclado por la enzima aleno-óxido ciclasa (AOC) al ácido 12-oxofitodienóico (OPDA) (Hamberg y Fahlstadius, 1990).

Las reacciones que se producen desde el ácido α -linolénico hasta OPDA se llevan a cabo en el plástido, donde el OPDA es transportado al peroxisoma (Yan *et al.*, 2013). El siguiente paso, que es la reducción del anillo de la ciclo pentanona del OPDA, es catalizado por la enzima oxofitodienoato reductasa (OPR). En *Arabidopsis* existen 6 genes que codifican a OPR, pero hasta este año solamente a OPR3 se le había considerado parte de la ruta de biosíntesis de jasmonatos (Schaller *et al.*, 2000).

Estudios recientes realizados por Chini *et al.* (2018) demostraron que existe una ruta alternativa de la biosíntesis de jasmonatos, en la que el OPDA entra directamente a la β -oxidación para producir 4-5, didehidro-JA (ddh-JA), el cual es reducido a JA por la enzima OPR2 (Chini *et al.*, 2018; Howe 2018; Wasternack y Hause 2018).

El producto obtenido por la reacción catalizada por OPR3, que es conocido como OPC-8, es sometido a tres ciclos de la β -oxidación para obtener como producto final el ácido jasmónico (Kombrink, 2012). Un esquema de la biosíntesis del ácido jasmónico está representado en la Figura 1.

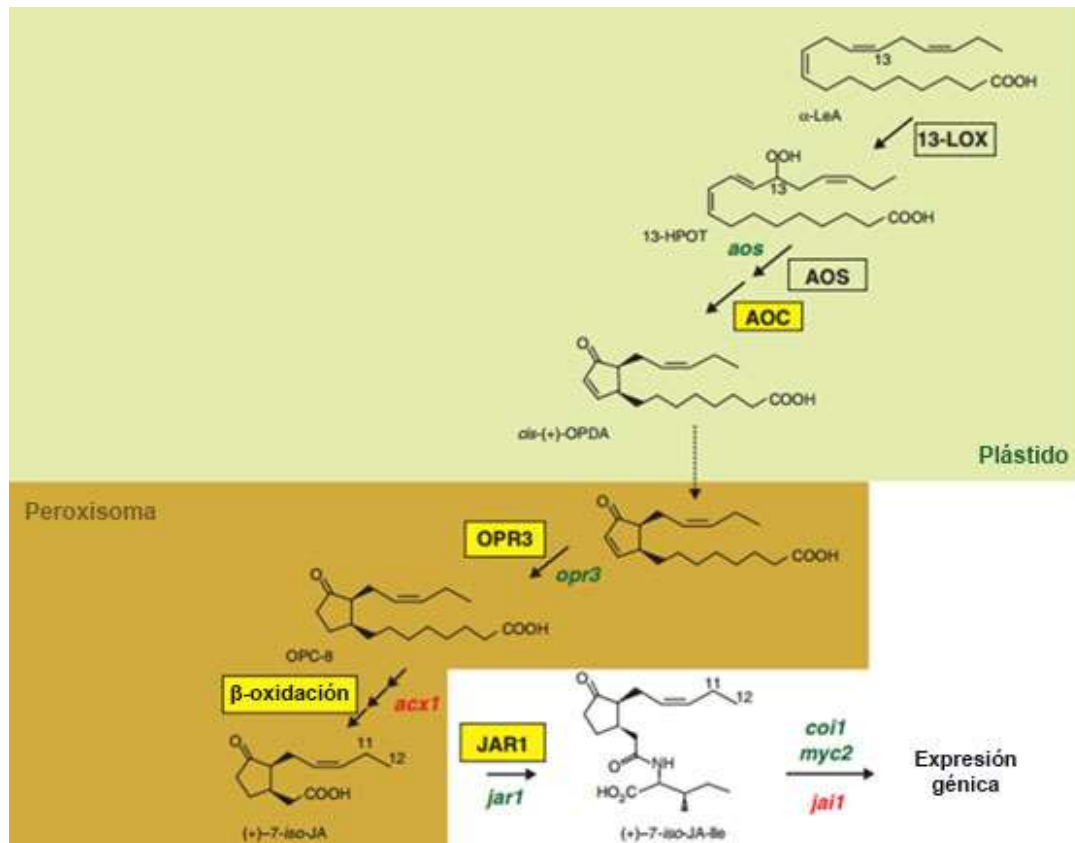


Figura 1. Biosíntesis de jasmonatos. Las enzimas que han sido cristalizadas se indican en cajas amarillas; las letras verdes muestran mutantes en Arabidopsis y las letras rojas en tomate (Wasternack y Hause, 2013). (*acx1*, acil-CoA-oxidasa 1; AOC, aleno óxido ciclasa; AOS, aleno oxidasa; *coi1*, insensible a coronatina 1; 13-HPOT, (13S)-ácido hidroperooctadecatrienoico; *jai1*, insensible a ácido jasmónico 1; JAR1, JA-aminoácido sintetasa 1; α-LeA, ácido α-linolénico; 13-LOX, 13-lipoxigenasa; *myc2*, factor de transcripción *bHLHzip* MYC2; OPR3, oxofitodienoato reductasa 3; OPC-8, 3-oxo-2-(2-pentenil)-ciclopentano-1-ácido octanóico; *cis*-(+)-OPDA, *cis*-(+)-oxofitodienoato.

1.1.2. Derivados del ácido jasmónico

Posteriormente a la β-oxidación, el ácido jasmónico puede ser transportado al citosol o puede ser sometido a diferentes modificaciones enzimáticas para dar lugar a numerosos metabolitos derivados (Gfeller *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2013).

Algunas de las modificaciones que sufre el ácido jasmónico son las siguientes:

- El grupo carboxilo C1 puede ser metil esterificado, conjugado con aminoácidos, descarboxilado o glicosilado.
- El grupo carbonilo C6 puede ser reducido.
- El doble enlace C9:10 puede ser reducido.
- Hidroxilación en el carbono C11 o C12 (Yan *et al.*, 2013).

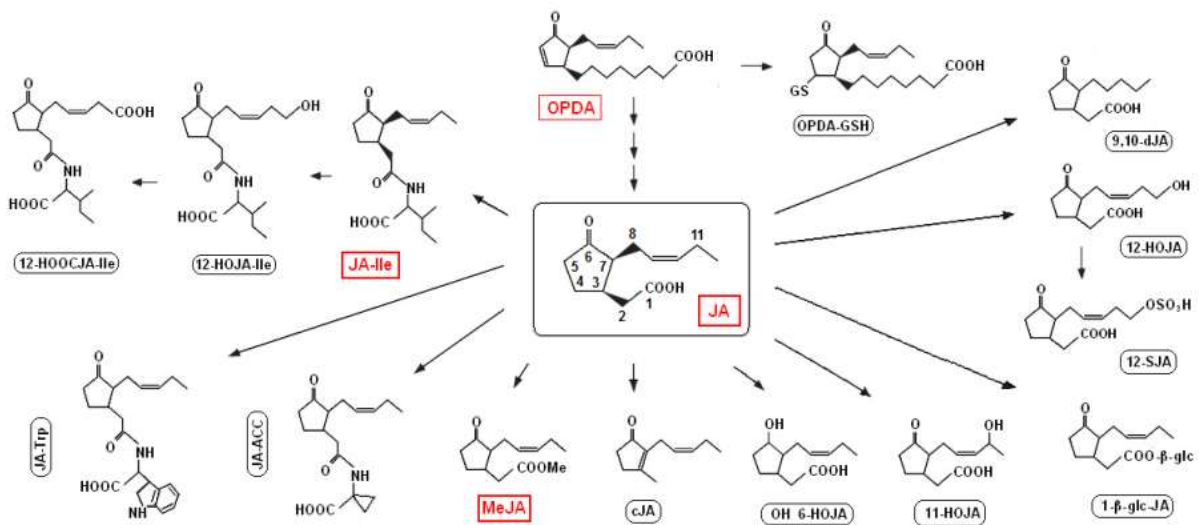


Figura 2. Metabolitos producidos a partir del ácido jasmónico (Gfeller *et al.*, 2010).

A pesar de la diversidad que existe de precursores, derivados y conjugados del ácido jasmónico, solamente algunos metabolitos como el metil-jasmonato (MeJA), 7-jasmonoil-isoleucina (JA-Ile) y el *cis*-jasmonato, así como el ácido jasmónico libre y su precursor OPDA, son considerados como las formas bioactivas de jasmonatos en plantas (Fig. 2) (Fonseca *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2013).

1.1.3. Percepción y señalización de jasmonatos

Posteriormente a la biosíntesis del ácido jasmónico y sus derivados, estas moléculas deben ser percibidas por la planta para poder inducir una respuesta. La señalización de jasmonatos se da a través del módulo SCF^{COI1}/JAZ/MYC2 (Fonseca *et al.*, 2009). Cuando hay un nivel bajo de JA-Ile, molécula activa para la señalización por esta vía, el factor de transcripción MYC2 se encuentra unido a la caja GCC en los promotores de genes de respuesta a jasmonatos, pero los genes se encuentran reprimidos por la acción de las proteínas JAZ, la proteína adaptadora NINJA (Novel Interactor of JAZ) y el corepresor TOPLESS. Frente a un estímulo, ya sea estrés biótico o abiótico o algún proceso de desarrollo, el nivel de JA-Ile de las plantas aumenta y el JA-Ile se une al receptor COI1, que forma parte del complejo SCF^{COI1}, en el que se encuentran las proteínas ASK1, culina, Rbx y la enzima conjugadora de ubiquitina E2. Este complejo SCF^{COI1} recluta a las proteínas JAZ y las ubiquitina para ser degradadas por el proteasoma 26S, lo que hace que el complejo represor se desensamble, liberando a MYC2 para poder transcribir los genes responsivos a jasmonatos, tales como los genes *JAZ* (Fig. 3) (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007; Kombrink, 2012).

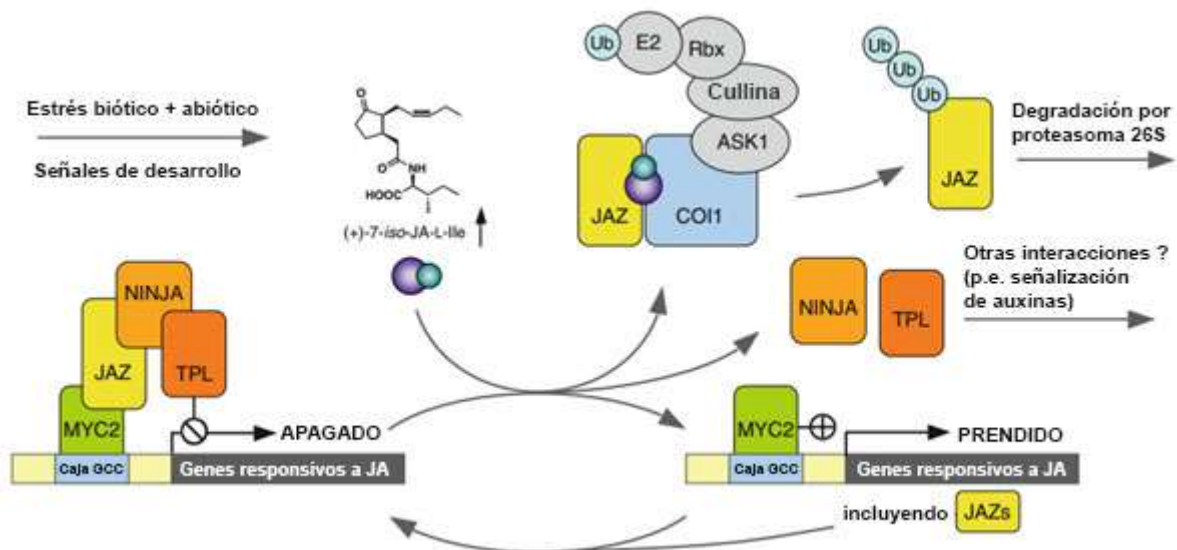


Figura 3. Percepción de los jasmonatos y señalización de genes responsivos a jasmonatos (Kombrink, 2012). (ASK1, cinasa reguladora de señales de apoptosis 1; COI1, insensible a coronatina 1; E2, enzima conjugadora de ubiquitina; JAZ, proteína de jasmonatos de dominio ZIM, MYC2, factor de transcripción *bHLH zip* MYC2; NINJA, (Novel Interactor of JAZ) nuevo interactor de JAZ; Rbx, proteína de caja RING; TPL, TOPLESS; Ub, ubiquitina).

1.1.4. Actividad biológica de los jasmonatos

Los jasmonatos modulan la expresión de muchos genes, lo que hace que regulen diversos procesos en la planta como su crecimiento, desarrollo y las respuestas a estreses bióticos y abióticos (Creelman y Mullet, 1997). Inicialmente, a los jasmonatos se les atribuyó un papel como inhibidores del crecimiento de plantas, pero a partir de la década de los 80 se empezaron a encontrar otros efectos como el incremento en los rendimientos en cultivos de fresa, soya, caña de azúcar y jitomate.

Sin embargo, una de las funciones que más ha sido estudiada es como regulador de la respuesta de defensa frente a una herida mecánica o por la acción de un patógeno (Eng, 2008). Muchas de estas funciones han sido identificadas por la aplicación exógena de jasmonatos o a través del estudio de mutantes de genes de la ruta biosintética o de señalización.

1.1.4.1. Respuesta al estrés

Los jasmonatos son una señal esencial para la defensa de la planta contra la herbivoría de insectos y un amplio espectro de patógenos, especialmente hongos necrotróficos. Las propiedades de defensa de los jasmonatos ha sido estudiada ampliamente en las últimas décadas y no existe ningún reporte sobre efectos negativos de los jasmonatos en la defensa de la planta contra insectos (Yan *et al.*, 2013).

Se ha reportado que después de un daño mecánico o un daño causado por herbivoría, el nivel de jasmonatos en la planta aumenta en el sitio del daño y posteriormente en toda la planta (Reymond *et al.*, 2004; Glauser *et al.*, 2008; Bari y Jones, 2009). Además, el daño a la planta o la aplicación exógena de ácido jasmónico o metil-jasmonato provoca la sobreexpresión de genes de la ruta de biosíntesis de jasmonatos (Leon y Sánchez-Serrano, 1999; Lorenzo y Solano, 2005; Mueller, 2007; Yan *et al.*, 2013). Los jasmonatos también están implicados en la inmunidad sistémica, transmitiendo información a larga distancia a través de la planta (Truman *et al.*, 2007).

Para poder ejercer su rol en defensa, los jasmonatos regulan diversos procesos en la planta como la síntesis de metabolitos secundarios tóxicos, producción de barreras morfológicas o cambios en la tasa de crecimiento vegetativo (Koo y Howe, 2009).

1.1.4.2. Regulación del desarrollo de la planta

El papel de los jasmonatos en el desarrollo de las plantas no ha sido estudiado tan ampliamente como su rol en defensa (Balbi y Devoto, 2008).

Sin embargo, los jasmonatos también ejercen una función sin la presencia de algún daño mecánico o estrés. Algunas señales producidas durante el desarrollo reproductivo, como péptidos u oligosacáridos derivados de la pared celular, pueden promover la síntesis de jasmonatos en algunos tejidos (Koo y Howe, 2009).

Los procesos de crecimiento de la planta que regulan los JA son inhibidos a concentraciones medias (10^{-4} a 10^{-6} M) de jasmonatos; sin embargo, otros procesos de morfogénesis, como la senescencia o maduración de los órganos, son promovidos o acelerados (Parthier, 1991).

Una de las funciones de los JA que más relevancia tiene en el desarrollo es como inhibidores del crecimiento. Estudios como el de Zhang y Turner (2008) muestran que el aumento en los niveles de JA en la planta reducen su crecimiento

en un 50% y que este proceso es debido a una inhibición de la mitosis, reduciendo el número de células de la planta, además que, observaciones en otros estudios muestran que la aplicación exógena de MeJA reduce el crecimiento de la raíz principal también en un 50% (Staswick *et al.*, 1992).

Otra de las funciones que se le ha atribuido a los JA es como promotores del desarrollo de órganos reproductivos. Se ha demostrado que mutantes en la biosíntesis y percepción de JA como *aos*, *opr3* o *coi1* presentan infertilidad masculina, debido a que hay una dehiscencia retrasada de las anteras al tiempo de la floración, los filamentos no se elongan lo suficiente al nivel del estigma, y menos del 97% del polen de las anteras es viable (Wasternack y Hause, 2013; Yan *et al.*, 2013; Qi *et al.*, 2015).

Estudios recientes han demostrado que la regulación de la transición del meristemo de inflorescencia a meristemo floral también está regulada por JA (Yuan y Zhang, 2015).

En plantas monocotiledóneas, como arroz y otros cereales, las inflorescencias se componen de espiguillas (ramas cortas y condensadas que contienen estructuras parecidas a hojas llamadas glumas o brácteas que rodean a las flores). En estudios recientes se ha demostrado que algunas proteínas implicadas en la biosíntesis y percepción de JA afectan el desarrollo de las espiguillas, por ejemplo, plantas de arroz mutantes en la aleno óxido ciclasa (OsAOC) presentan una floración más temprana, pero las brácteas más alta y más baja son estériles. Además, en maíz los JA juegan un rol muy importante en la determinación del sexo de las plantas, ya que es una lipoxigenasa involucrada en la síntesis de JA la que establece que en el meristemo floral, inicialmente bisexual, se produzca la muerte celular del primordio de pistilo (Acosta *et al.*, 2009; Yuan y Zhang, 2015). Por otro lado, mutaciones en los genes *OPR7* y *OPR8*, también en maíz convierten las inflorescencias de masculinas a femeninas (Yan *et al.*, 2012).

Debido a la interacción que se presenta entre las auxinas y JA, a éstos últimos se les puede atribuir un papel en la formación de raíces laterales y

adventicias. En apoyo a esta idea, mutantes insensibles a JA como *coi1-16*, producen menos raíces laterales y más raíces adventicias (Wasternack y Hause, 2013).

1.1.5. Reguladores transcripcionales de la ruta de jasmonatos

Los factores de transcripción son proteínas que se unen al ADN y regulan la expresión de genes. La regulación transcripcional de los genes eucarióticos durante el desarrollo o como respuesta a señales extracelulares es central para la expresión de genes en tejidos y etapas específicas y para la regulación de la actividad génica en respuesta a un estímulo específico (Tjian y Maniatis, 1994; Latchman, 1997).

Como ya se había mencionado, en la ruta de percepción y señalización de jasmonatos intervienen reguladores transcripcionales como MYC2, quienes regulan genes de respuesta a jasmonatos. Además, en la literatura se han reportado algunos otros factores que regulan transcripcionalmente la vía de los jasmonatos. Por ejemplo, Ito *et al.* (2007), demostraron que el factor de transcripción AGAMOUS controla el desarrollo de los estambres en *Arabidopsis* a través de la regulación directa del gen biosintético de jasmonatos *DAD1*. Van der Does *et al.* (2013), reportaron que a través de un efecto negativo en el activador transcripcional ORA59, la ruta del ácido salicílico inhibe la señalización de jasmonatos río abajo del complejo COI1-JAZ, uniéndose a la caja GCC de los promotores de los genes responsivos a jasmonatos. Song *et al.* (2011) especularon que las proteínas JAZ interactúan con MYB21 y MYB24 para disminuir su función transcripcional, así cuando COI1 recluta a las proteínas JAZ, éstas se degradan en el proteasoma, liberando a MYB21 y MYB24 que activan la expresión de varios genes esenciales para el desarrollo de la antera y la elongación de los filamentos en *Arabidopsis*. Con nuevos reguladores de la vía de jasmonatos siendo descubiertos en los últimos años, es muy posible que aún no se haya descrito por completo la ruta y que más reguladores puedan ser encontrados en futuros trabajos.

2. ANTECEDENTES

2.1. El gen *BOLITA*

El gen *BOLITA* (*BOL*) codifica a una proteína de 306 aminoácidos cuya función es de un factor de transcripción perteneciente a la familia ERF y que contiene un dominio AP2/ERF (Marsch-Martínez *et al.*, 2006). En el genoma de *Arabidopsis* el gen *DORNRÖSCHEN / ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 1* (*DRN/ESR1*) es el homólogo más cercano a *BOL*, el cual se ha reportado que mantiene y regenera el meristemo, además que comparte similitud con *BOL* en que ninguno de los dos contiene intrones (Kirch *et al.*, 2003).

El gen *BOL* fue caracterizado en una mutante encontrada en 2002 por Marsch-Martínez *et al.*, por medio de líneas sobreexpresantes de *Arabidopsis* y tabaco y de una mutante de ganancia de función en *Arabidopsis* llamada *bol-D*, obtenida por la técnica *activation tagging*, la cual permite realizar inserciones en el DNA de la planta que son capaces de activar genes, usando el sistema de transposones *En-1* de maíz (Marsch-Martínez *et al.*, 2002, 2006). El gen *BOL* ha sido denominado de diferentes formas por otros grupos de trabajo. Kirch *et al.*, (2003) llamaron al gen *DORNRÖSCHEN-LIKE* (*DRNL*) por la homología presentada con *DRN/ESR1*, e Ikeda *et al.* (2006) lo denominaron *ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 2* (*ESR2*), por la función que el gen tiene en la regeneración de los brotes.

2.1.1. Patrón de expresión de *BOL*

Marsch-Martínez *et al.* (2006), y Nag *et al.* (2007) utilizaron líneas reporteras del gen *BOL* (*pBOL-GUS* y *pDRNL-GUS*, respectivamente) para realizar un análisis de expresión espacial y temporal de *BOL* en plantas de *Arabidopsis*.

La expresión de GUS en ambas líneas reporteras fue detectada en diferentes etapas del desarrollo y el patrón de expresión se presentó en regiones similares. En el embrión, *BOL* se expresa en la punta de los cotiledones en desarrollo (Figura 4 E). En los primeros dos días de edad de las plántulas (Figura 4 A, F) la actividad de GUS fue detectada en el meristemo apical del brote y en las regiones distales de los cotiledones. En plántulas de 5 días de edad (Figura 4 B, G) la señal de GUS va perdiendo intensidad en el meristemo apical del brote y se vuelve más intensa en los primordios de hoja. Las hojas jóvenes se tiñen primero en la punta (Figura 4 H) y posteriormente en puntos separados en el borde de la hoja (hidátodos) (Figura 4 D, G). Además, las hojas maduras también muestran una tinción en brotes axilares jóvenes (Figura 4 D), pero la señal de los hidátodos se va perdiendo. En etapas posteriores del desarrollo, como en las inflorescencias, la señal de GUS es detectable en los pétalos y estambres en desarrollo (Figura 4 I) (Marsch-Martínez *et al.*, 2006; Nag *et al.*, 2007).

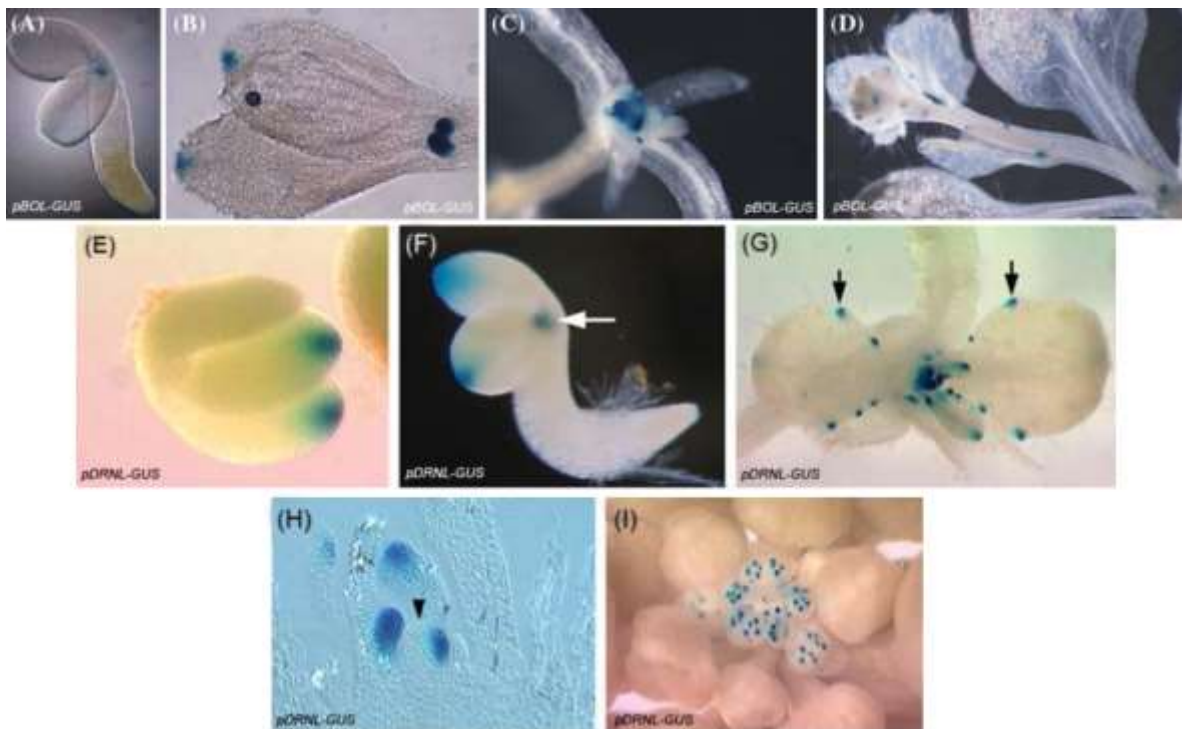


Figura 4. Patrón de expresión de *BOL*. (A-D) Plantas *pBOL-GUS*. (A) Plántula de 1 día después de la germinación (ddg). (B) Plántula de 3 ddg. (C) Plántula de 13 ddg. (D) Planta adulta en etapa de floración. (E-I) Plantas *pDRNL-GUS*. (E) Embrión. (F) Plántula muy joven, previa a la emergencia de hojas. La flecha muestra el meristemo apical del brote. (G) Plántula que muestra expresión de *BOL* en los hidátodos (flecha). (H) Corte longitudinal de una plántula de *pDRNL-GUS*. La flecha muestra el meristemo apical del brote. (I) Inflorescencia en etapa 9. (Modificado de Marsch-Martínez *et al.*, 2006, Cuadros A-D; y Nag, *et al.*, 2007, Cuadros E-I).

2.1.2. Mutante *bol-D*

La mutante *bol-D*, que es una mutante de ganancia de función del gen *BOL*, presenta alteraciones drásticas en el desarrollo de la planta. Esta mutante tiene una roseta de un tamaño muy pequeño, que mide desde 0.5 a 1 cm. Las hojas son de tamaño pequeño, no tienen peciolo, la lámina no es plana y presentan epinastia (curvatura hacia abajo) (Figura 5 A). Además, la elongación del tallo se ve afectada en esta mutante, por lo que una planta adulta llega a medir alrededor de 3 cm de altura (Figura 5 B), que representa una reducción del tamaño de más de 10 veces en comparación con una planta silvestre (Marsch-Martínez *et al.*, 2006).

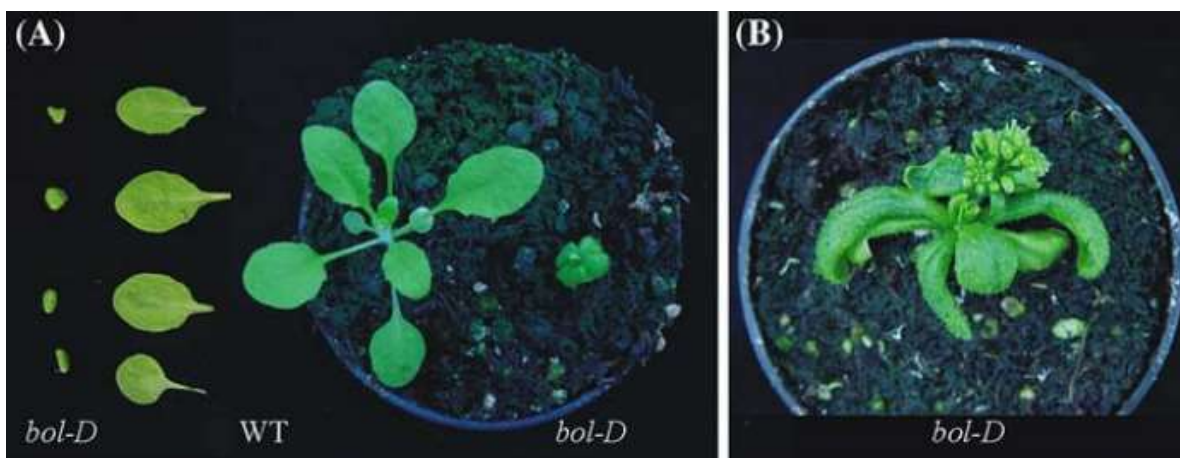


Figura 5. Fenotipo de la mutante *bol-D*. (A) Comparación de hojas de la roseta de plantas *bol-D* y silvestres. (B) Planta adulta de *bol-D* de más de 4 semanas de edad (Marsch-Martínez *et al.*, 2006).

Las flores de la mutante *bol-D* también se ven afectadas. Los capullos florales se encuentran agrupados juntos (Figura 6 B), y en las flores maduras de plantas jóvenes los pétalos son cortos con coloración verde y las anteras son cortas sin polen visible (Figura 6 A). Sin embargo, en plantas de mayor edad las flores recuperan parcialmente el fenotipo silvestre, presentando una reducida fertilidad masculina, además de que las silicuas son más cortas y más anchas que las silvestres (Figura 6 B). La mutación que ocasiona que la expresión de *BOL* se potencie es semi-dominante, por lo que los fenotipos que se obtienen de diferentes plantas *bol-D* pueden variar (Marsch-Martínez *et al.*, 2006).

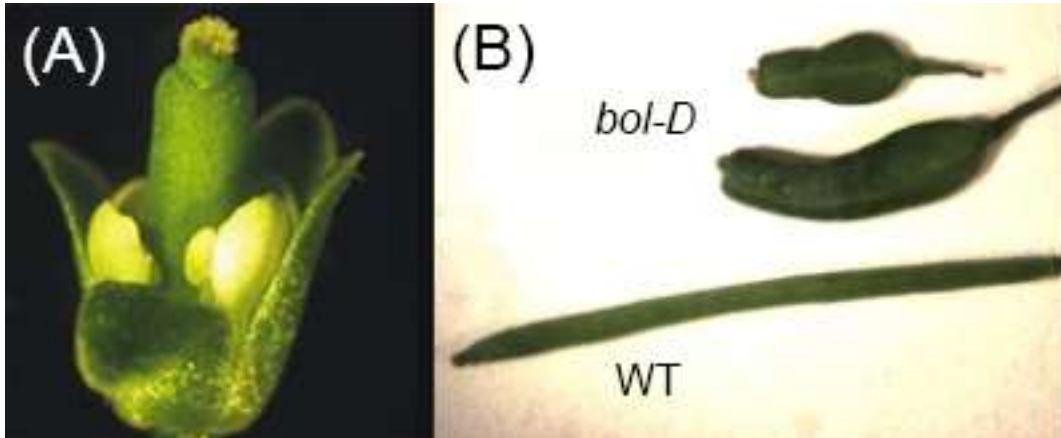


Figura 6. Fenotipo de flores y silicuas de plantas *bol-D*. (A) Flor madura de planta joven *bol-D*. (B) Comparación entre silicuas de plantas *bol-D* y silvestres (Modificado de Marsch-Martínez *et al.*, 2006).

2.1.3. Sobre expresión de *BOL* en tabaco

El gen *BOL* parece tener funciones conservadas en otras plantas. De igual manera que en plantas *bol-D* en *Arabidopsis*, las plantas con sobreexpresión de *BOL* en tabaco (*35S-BOL*) presentan hojas curvadas y más pequeñas que las plantas silvestres (Figura 7 B) y su patrón de venación se ve alterado (Figura 7 E, F). Las flores de estas plantas también presentan cambios en su morfología, sus

pétalos son más amplios que los silvestres y las flores desarrollan, entre los pétalos y sépalos, pétalos ectópicos más pequeños (Figura 7 C), curvados longitudinalmente y en algunas veces cerrados formando un círculo parecido a la corola de la flor (Figura 7 D) (Marsch-Martínez *et al.*, 2006).

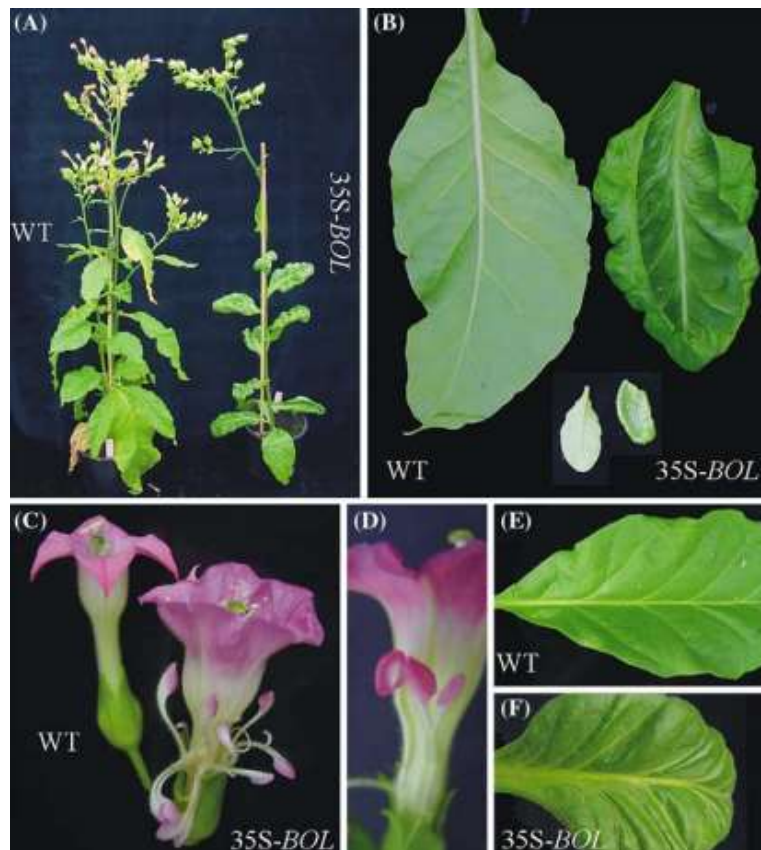


Figura 7. Fenotipo de plantas de tabaco *35S-BOL*. (A) Planta *35S-BOL* comparadas con la planta silvestre; (B, E y F) hojas silvestres y *35S-BOL*. (B) Curvatura de las hojas *35S-BOL* (arriba) y de las plantas *bol-D* (abajo) en comparación con plantas silvestres. (E y F) El patrón de venación en las plantas *35S-BOL* se encuentra desorganizado en comparación con la planta silvestre. (C y D) Comparación entre flores *35S-BOL* y silvestres. (C) Las flores *35S-BOL* son más grandes y presentan pétalos ectópicos entre los pétalos y sépalos. (D) Algunos pétalos ectópicos se cierran para formar un tubo parecido a la corola de la flor silvestre (Marsch-Martínez *et al.*, 2006).

2.1.4. Mutante *drnl-2*

En 2007, Nag *et al.* caracterizaron a *drnl-2*, mutante de pérdida de función del gen *BOL*, en una búsqueda de potenciadores (“enhancers”) o supresores de los fenotipos de *pistillata-5* (*pi-5*) para identificar nuevos genes que estuvieran involucrados en el desarrollo de pétalos y estambres. En esta búsqueda de mutantes se encontró que la pérdida de función de *DRNL* hacía más severo el fenotipo de *pi-5*, cuyo fenotipo, en el que en las flores de las mutantes los sépalos crecen en el verticilo donde deberían crecer los pétalos, se ve afectado en que la planta no desarrolla estambres.

El defecto más evidente en el fenotipo de la planta mutante *drnl-2* se observa en el tercer verticilo floral, en el que los estambres se convierten en órganos parecidos a filamentos (Figura 8 A, C, D). En plantas silvestres, en el tercer verticilo se desarrollan en promedio 5.88 órganos, pero en la mutante *drnl-2* en promedio crecen 3.11. Comúnmente estos órganos son filamentos que se parecen a los filamentos de las anteras, pero son más cortos y en la mayoría no se observa ninguna antera, aunque en los pocos estambres que se desarrollan el polen es viable (Nag *et al.*, 2007).

Los pétalos de la mutante *drnl-2* también presentan pequeños defectos. Aunque el número de pétalos no cambia, son más cortos, arrugados y menos lobulados que en la planta silvestre; además, algunos de los sépalos se desarrollan como pétalos (Figura 8 B) (Nag *et al.*, 2007).

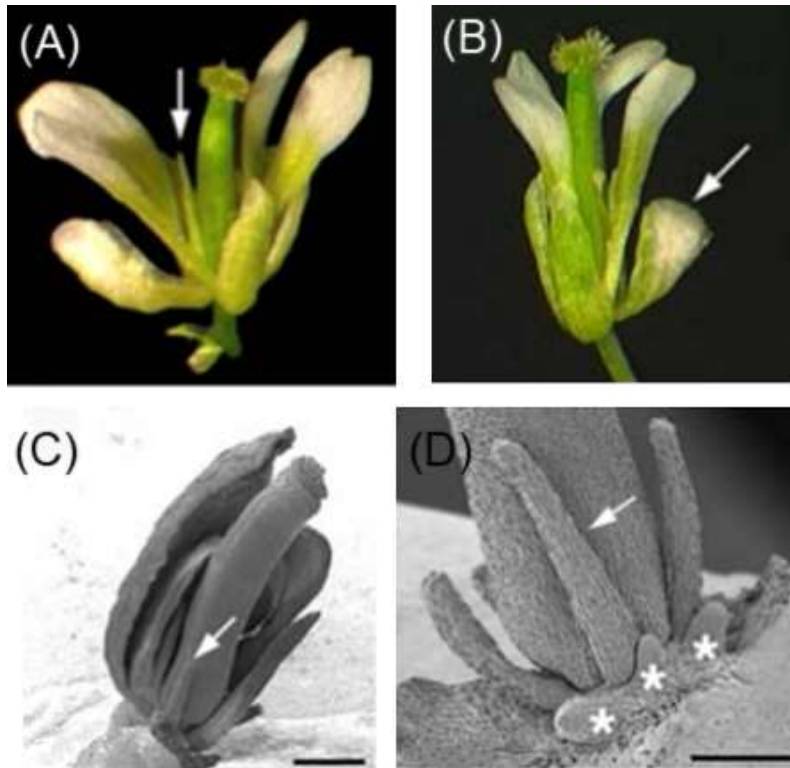


Figura 8. Flores mutantes *drnl-2*. (A) Flor mutante *drnl-2*. La flecha muestra el filamento que crece en el tercer verticilo. (B) Flor mutante *drnl-2*. La flecha muestra un sépalo que adquirió identidad de pétalo. (C) Micrografía electrónica de barrido de una flor mutante *drnl-2*. Tres sépalos y un pétalo fueron disectados para permitir la visualización de los órganos del tercer verticilo. La flecha muestra el filamento. (D) Micrografía electrónica de barrido de una flor mutante *drnl-2* a la que se le han removido los órganos de los verticilos 1 y 2, dejando tres filamentos alrededor del gineceo (Modificado de Nag *et al.*, 2007).

2.2. Posible relación entre el gen *BOL* y la ruta de JA

Al analizar las mutantes tanto de ganancia como de pérdida de función, se observaron algunas características reminiscentes de efectos del incremento o disminución del contenido, sensibilidad o respuesta a JA. Por ejemplo, la inhibición del crecimiento en las plantas con ganancia de función, y las alteraciones del desarrollo de anteras en las mutantes con pérdida de función. Ambas características reportadas en la literatura parecían ser similares.

Otra similitud relevante es la secuencia presente en regiones regulatorias que responden a JA o a *BOL*. Estudios de genes de respuesta a jasmonatos han identificado al elemento GCC en los promotores de dichos genes, como un elemento de respuesta a jasmonatos (Brown *et al.*, 2003; Xu y Timko, 2004; Van der Does *et al.*, 2013; Zarei *et al.*, 2013). Es interesante que el elemento GCC también se haya reportado como el sitio que BOL reconoce en el promotor de uno de los genes que se ha propuesto como blanco (Eklund *et al.*, 2011).

Debido a estas similitudes, es posible que haya una relación cercana entre el factor de transcripción BOL y la ruta de jasmonatos. Además, en el laboratorio se ha observado un incremento en el contenido de jasmonatos en las mutantes con ganancia de función de *Arabidopsis*, y líneas transformantes sobreexpresantes de tabaco (Durán-Medina, 2013).

2.3. Expresión diferencial de genes en mutantes del gen *BOL*

2.3.1. Microarreglo

Para poder investigar si la sobreexpresión de *BOL* altera la expresión de otros genes que puedan estar provocando el fenotipo de la alteración del desarrollo en la mutante *bol-D*, Marsch-Martínez *et al.* (2006), realizaron un análisis de transcripción global empleando un microarreglo, comparando los transcritos de las hojas más jóvenes de plantas *bol-D* y silvestres. Los resultados mostraron que varios genes relacionados con el metabolismo y transporte de lípidos y genes de histonas se encontraban sobre regulados. Por otro lado, genes involucrados en señalización, regulación transcripcional y señalización, y biosíntesis de hormonas se encontraban reprimidos.

De un total de 1,427 genes con un cambio en la expresión mayor o menor a 1.3 (logaritmo base 2 de la proporción en que que aumentó o disminuyó la expresión, indicado como “fold change”, FC, en la tabla 1), se encontraron 5 genes relacionados con jasmonatos, los cuales se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Genes relacionados con jasmonatos con un cambio en la expresión en el microarreglo de Marsch-Martínez *et al.* (2006).

Locus	Descripción	FC
AT1G32640	<i>Proteína bHLH ATMYC2, JAI1, JIN1, RD22BP1</i>	-2.02
AT1G17990	<i>12-oxofitodienoato reductasa (OPR)</i>	-2.08
AT5G42650	<i>Aleno óxido sintasa (AOS)</i>	-2.36
AT2G06050	<i>12-oxofitodienoato reductasa (OPR3) (DDE1)</i>	-2.57
AT1G76690	<i>12-oxofitodienoato reductasa (OPR2)</i>	-3.04

2.3.2. Transcriptoma

Los datos del microarreglo de Marsch-Martínez (2006) fueron obtenidos comparando plantas silvestres con plantas que expresaban constitutivamente el gen *BOL* (*bol-D*), lo que sabemos que causa una reducción en el tamaño de la planta. Zhang y Turner (2008) demostraron que al provocar una inhibición del crecimiento de la planta aumenta el nivel exógeno de ácido jasmónico debido al estrés. Por lo tanto, para comprobar que el cambio en la expresión de genes de jasmonatos en el microarreglo de Marsch-Martínez (2006) no era debido al estrés ocasionado por la reducción del tamaño de la planta *bol-D*, sino por la acción del gen, en el laboratorio de Identidad Celular de Plantas de Cinvestav-Unidad Irapuato se procedió a hacer uso de la línea transformante *35S-ESR2-ER*. Esta línea es utilizada para inducir la actividad del gen *BOL*, ya que contiene el promotor constitutivo 35S fusionado con el gen *BOL* y un receptor de β -estradiol; además, la proteína fusionada está acoplada a chaperonas, las cuales no permiten que el factor de transcripción *BOL* entre al núcleo de la célula para transcribir genes, pero al aplicar β -estradiol a la planta se pierde la unión de la proteína fusionada con las chaperonas y le permite entrar al núcleo. Con esta línea se realizó un transcriptoma comparando entre plantas silvestres y plantas *35S-ESR2-ER* después de 30 min y 8 horas de la

inducción con β -estradiol. Además, en la inducción a los 30 minutos también se le agregó a la planta cicloheximida, un inhibidor de la traducción de proteínas, para poder observar blancos potencialmente directos del factor de transcripción. En este análisis, se encontraron nuevamente genes relacionados con jasmonatos que presentaron un cambio en su expresión a los 30 minutos y a las 8 horas, y se presentan en las tablas 2 y 3, respectivamente.

Tabla 2. Genes relacionados con jasmonatos con un cambio en su expresión a los 30 minutos después de la inducción de *BOL* en el transcriptoma.

Locus	Descripción	FC
AT3G55970	<i>Gen regulado por jasmonatos 21 (JRG21)</i>	4.49
AT2G46370	<i>JA-aminoácido sintetasa (JAR1)</i>	7.68
AT1G30135	<i>Proteína de jasmonatos de dominio zim 8 (JAZ8)</i>	4.98
AT5G46760	<i>Factor de transcripción interactor de JAZ 3 (MYC3)</i>	-0.71
AT1G76680	<i>12-oxofitodienoato reductasa 1 (OPR1)</i>	-1.45
AT2G06050	<i>12-oxofitodienoato reductasa 3 (OPR3)</i>	2.42
AT1G73450	<i>Proteína de jasmonatos de dominio zim 6 (JAZ6)</i>	-0.70
AT3G48520	<i>Jasmonoil-isoleucina-12-hidroxilasa (CYP94B3)</i>	6.20

Tabla 3. Genes relacionados con jasmonatos con un cambio en su expresión a las 8 horas después de la inducción de *BOL* en el transcriptoma.

Locus	Descripción	FC
AT3G55970	<i>Gen regulado por jasmonatos 21 (JRG21)</i>	7.03
AT1G30135	<i>Proteína de jasmonatos de dominio zim 8 (JAZ8)</i>	5.86
AT5G13220	<i>Proteína de jasmonatos de dominio zim 10 (JAZ10)</i>	6.59
AT1G17380	<i>Proteína de jasmonatos de dominio zim 5 (JAZ5)</i>	3.51
AT3G25780	<i>Aleno óxido ciclasa 3 (AOC3)</i>	2.81

AT1G13280	<i>Aleno óxido ciclasa 4 (AOC4)</i>	-0.92
AT1G19180	<i>Proteína de jasmonatos de domino zim 1 (JAZ1)</i>	2.13
AT2G46370	<i>JA-aminoácido sintetasa (JAR1)</i>	0.62
AT2G06050	<i>Oxofitodienoato reductasa 3 (OPR3)</i>	2.16
AT1G32640	<i>Factor de transcripción interactor de JAZ 2 (MYC2)</i>	2.31
AT3G25770	<i>Aleno óxido ciclasa 2 (AOC2)</i>	-0.71
AT3G45140	<i>Lipoxigenasa 2 (LOX2)</i>	-3.35
ATG350440	<i>Metil-esterasa 10 (MES10)</i>	-2.08
AT3G48520	<i>Jasmonoil-isooleucina-12-hidroxisilasa (CYP94B3)</i>	9.07

Los cambios observados en la expresión de genes relacionados con jasmonatos a los 30 minutos y 8 horas después de la inducción de *BOL*, sugieren que su efecto en la vía podría ser un efecto directo o temprano.

En resumen, existen similitudes entre algunos fenotipos de mutantes con ganancia o pérdida de función del gen *BOL* y perturbaciones de la ruta de jasmonatos. Además, hay una gran coincidencia de la secuencia que reconoce el factor de transcripción y la secuencia de respuesta a jasmonatos en genes que responden a esta hormona. Esto sugiere que podría existir una relación entre el factor de transcripción *BOL* y la ruta de jasmonatos. Además, entre los genes cuya expresión se altera al aumentar la actividad de *BOL*, se encuentran algunos genes involucrados en la ruta de esta hormona o responsivos a éstas. Por lo tanto, parece existir una relación entre el factor de transcripción y la ruta de jasmonatos, que sería interesante explorar.

3. HIPOTESIS

Al menos una parte de las funciones de *BOL*, está relacionada con la ruta de jasmonatos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar si existe una relación entre el gen *BOL* y la ruta de los jasmonatos.

4.2. Objetivos específicos

1. Verificar el cambio en la expresión de los genes de JA en las mutantes de *BOL*.
2. Comprobar y comparar los fenotipos reportados de las mutantes de *BOL* y JA y los tratamientos con MeJA, en las mismas condiciones y tiempos de desarrollo.
3. Evaluar si la aplicación exógena de JA complementa el fenotipo alterado de la mutante con pérdida de función.
4. Evaluar los cambios en el nivel de jasmonatos en plantas, al inducir la actividad de *BOL*.
5. Evaluar la respuesta del gen *BOL* a perturbaciones en la ruta de JA.
6. Obtener líneas marcadoras, y evaluar el cambio en la expresión de líneas marcadoras de JA.
7. Obtener material necesario para posteriores evaluaciones de interacciones genéticas entre mutantes afectadas en la ruta de JA y mutantes de *BOL*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material vegetal

- *Arabidopsis thaliana*

Mutante *bol-D* (Marsch-Martínez *et al.*, 2006). Mutante de ganancia de función del gen *BOL*.

Mutante *drnl-2* (Nag *et al.*, 2007). Mutante de pérdida de función del gen *BOL*.

Transformante *35S-ESR2-ER* (Ikeda *et al.*, 2006; Eklund *et al.*, 2011). Línea inducible de la actividad del gen *BOL*, en la que el promotor constitutivo 35S está fusionado con el gen *BOL* y éste con el gen del receptor de β -estradiol de mamíferos.

Línea marcadora *pBOL-GUS* (Marsch-Martínez *et al.*, 2006).

Líneas marcadoras de jasmonatos

- *pLOX2-GUS* (Schommer *et al.*, 2008)
- *4XGCC-GUS* (Van der Does *et al.*, 2013). Línea transgénica que contiene 4 copias de la caja GCC fusionadas a un promotor mínimo 35S y el gen reportero *GUS*.
- *Jas9-VENUS* (Larrieu *et al.*, 2015). Línea transformante en la que el motivo Jas de la proteína JAZ9 está fusionado a la proteína fluorescente VENUS. Debido a que el motivo Jas es el responsable de la degradación de las proteínas JAZ, al percibir un aumento de JA, la señal de VENUS disminuye. El vector para realizar la transformación de la planta fue proporcionado por el Laboratorio de Nutrición Mineral de Plantas de la Unidad de Genómica Avanzada de Cinvestav Irapuato.
- *pJaz10-GUSPlus* (Acosta *et al.*, 2013). Línea en la que el promotor del gen *JAZ10* está fusionado al gen *GUSPlus*. El gen *GUSPlus*, que fue

aislado de *Staphylococcus* sp., codifica a una β -glucuronidasa que es más sensible, estable y tolerante a la fijación en plantas que la aislada de *E. coli*.

Mutantes de genes de jasmonatos

- *coi1-1* (Van der Does *et al.*, 2103)
- *jaz8* (SALK_200208C)
- *myc2* (SALK_017005C)
- *aos* (CS6149)
- *jar1-11* (CS67935)

- *Nicotiana tabacum*

Transformante 35S-BOL (Marsch-Martínez *et al.*, 2006). Línea sobreexpresante del gen *BOL*.

- *Solanum lycopersicum*

Línea marcadora de jasmonatos JERE-GUS (Rushton *et al.*, 2002). Línea transgénica en la que el elemento de respuesta a ácido jasmónico (AGACCGCC) está fusionado al gen que codifica a la β -glucuronidasa. Su fondo silvestre es la variedad MicroTom.

5.2. Condiciones de crecimiento

5.2.1. Crecimiento *in vitro*

Previamente a la siembra, las semillas fueron desinfectadas con un lavado con etanol al 70%, uno con cloro al 20% y tres con agua destilada estéril, cada uno

por 5 minutos. Las semillas se sembraron en medio MS 0.5x (Caisson Labs), 1% de agar para plantas (PhytoTechnology Laboratories TM) y sacarosa 1%. Las placas se colocaron a 4°C por 48-72 h y posteriormente se transfirieron a una cámara de crecimiento a 22°C en condiciones de día largo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, por el tiempo que cada experimento requiera.

5.2.2. Crecimiento en invernadero

Las semillas de jitomate y tabaco fueron germinadas en charolas de germinación de unicel de 60 pozos con un sustrato general, que contenía Sunshine Mix mezcla 3, tierra de hoja, tierra de lama, perlita y vermiculita a una proporción 3:2:1:1:1. Las charolas se cubrieron con una bolsa negra hasta la aparición de los cotiledones. Posteriormente a la aparición de las primeras hojas verdaderas, las plantas fueron trasplantadas a macetas de 750 ml con sustrato general donde crecieron en las condiciones de luz de la temporada del año y una temperatura que varió entre los 30 y 35°C.

Para *Arabidopsis*, las semillas se sembraron en charolas de plástico con mezcla para *Arabidopsis*, que contenía Sunshine Mix mezcla 3, perlita y vermiculita a una proporción 3:1:1. Las charolas se colocaron a 4°C por 72 horas y después se transfirieron a una cámara de crecimiento a 22°C con condiciones de día largo de 16 horas luz y 8 de oscuridad. Posteriormente a la aparición de las hojas verdaderas, se pasaron las charolas al invernadero donde permanecieron cerradas por 24 horas y crecieron en condiciones de luz acorde a la temporada del año y una temperatura que varió entre los 22 y 28°C.

5.3. Tinción histológica con GUS

Las líneas con la fusión del gen *GUS*, que codifica a la enzima β -glucuronidasa, fueron puestas en una solución X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido) (40 mM) con ferri y ferrocianuro (100 mM). La enzima β -

glucuronidasa utiliza el X-Gluc como sustrato, y la reacción que se produce genera una coloración azul en los tejidos donde el gen se expresa (Jefferson *et al.*, 1987). Los tejidos que se analizaron se colocaron frescos en la solución con X-Gluc y se dejaron incubar a 37°C toda la noche. Para eliminar la clorofila de los tejidos y permitir una mejor visualización de la coloración de GUS, los tejidos se lavaron una vez con etanol al 96% y 3 lavados posteriores con etanol al 70% para *Arabidopsis*, y lavados sólo con etanol al 100% para jitomate.

5.4. Transformación de la línea *Jas9-VENUS*

Se obtuvo el vector que contenía la construcción *Jas9-VENUS* del Laboratorio de Nutrición Mineral de Plantas de la Unidad de Genómica Avanzada de Cinvestav Irapuato.

Primero se realizó una transformación por choque térmico de células de *E. coli* de acuerdo al siguiente protocolo: se añadió 1 µl de vector a un tubo eppendorf de 1.5 ml con 200 µl de células competentes y se incubó en hielo por 30 min. Se dio un choque térmico a las células colocando el tubo eppendorf por 30 segundos a baño maría a 42°C e inmediatamente se colocó el tubo en hielo por 2 min. Se añadieron 5 volúmenes de SOC o medio LB al tubo y se incubó a 37°C por 1 hora. La suspensión se distribuyó en una caja Petri con medio LB con espectinomicina para la selección de transformantes, y se incubó a 37°C toda la noche.

Posteriormente se realizó un “miniprep” para extracción de plásmido por la técnica modificada de Birnboim y Doly (1979) haciendo previamente un cultivo líquido en medio LB con espectinomicina de las células transformantes de *E. coli* e incubando a 37°C durante toda la noche. Del cultivo líquido de *E.coli* se obtuvo un paquete celular y se resuspendió en 150 µl de solución I BD (Tris-HCl 1 M pH=8, EDTA 0.25 M, glucosa 1 M). Se agregaron 300 µl de solución II BD, se agitó por inversión hasta mezclar perfectamente y se dejó en baño de hielo por 10 min. Se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y estéril con 700 µl de isopropanol. Se agitó hasta mezclar perfectamente y

se dejó reposar en baño de hielo por 15 min o a -20°C por 20 min. Se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante, la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 70%, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min y se eliminó el sobrenadante. Se secó la pastilla calentando a 65°C y se resuspendió en 40 µl de agua.

Sabiendo previamente que el vector en el que estaba la construcción *Jas9-VENUS* contenía un sitio de restricción para la enzima EcoRI, se procedió a realizar una digestión del plásmido para verificar que al cortarlo, éste se linearizara y generara un fragmento de 12 kb.

Después se procedió a realizar una transformación de células de *Agrobacterium tumefaciens* por el método de electro-shock. Para ello, se tomó un tubo eppendorf con 50 µl de células competentes y se derritieron en hielo para añadir 1 µl del plásmido a las células de *Agrobacterium* y transferirlas a celdas para electro-shock frías. Las celdas con la bacteria y el plásmido se incubaron unos minutos en hielo y se les dio en shock eléctrico con el electroporador. Las celdas se volvieron a poner en hielo y se añadió inmediatamente 1 ml de SOC. La suspensión se transfirió a un tubo eppendorf y se incubó a 28°C por 2 horas para después distribuirla en una placa con medio LB con rifampicina, ampicilina y espectinomicina y se incubó a 28°C por 2 días.

Posteriormente se realizó la transformación de plantas Col-0 con *A. tumefaciens* que contenía el plásmido con *Jas9-VENUS* por medio del protocolo de “floral dip” (Clough y Bent, 1998).

Las plantas transformantes fueron seleccionadas en placas de medio MS con higromicina (15 mg/ml) siguiendo el protocolo de Harrison *et al.* (2008). Se observaron las plantas transformantes en un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 800 a una longitud de onda de 475 nm para confirmar que la fluorescencia coincidiera con la reportada por Larrieu *et al.* (2015).

5.5. RT-PCR de genes de la ruta de los jasmonatos

Para verificar el cambio en la expresión de genes de la ruta de los jasmonatos en las líneas mutantes de *BOL*, se realizó extracción de RNA de rosetas (parte aérea, sin raíz) de plantas de *Arabidopsis* de aproximadamente 2 semanas de edad de las líneas *bol-D*, *drnl-2*, *35S-ESR2-ER* y sus controles silvestres crecidas *in vitro*. Para la línea inducible *35S-ESR2-ER* se tomaron 2 tiempos de colección de tejido: media hora posteriormente a la aplicación de β -estradiol y cicloheximida, para inducir la actividad del gen y bloquear la traducción de proteínas, y ocho horas después de la aplicación de β -estradiol. Para la extracción de RNA se utilizó Trizol (Invitrogen) con el protocolo del proveedor. Se trataron aproximadamente 4 μ l del RNA obtenido con DNAsa I para eliminar los restos de DNA. Con 10 μ l del RNA libre de DNA se realizó la transcripción reversa con el oligo dT (5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT-3') y la enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* (Invitrogen) con el protocolo del proveedor. El cDNA que se obtuvo se utilizó para hacer PCR con los oligonucleótidos de la Tabla 4.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para realizar RT-PCR.

Gen	Oligo sentido	Oligo antisentido	Tamaño del fragmento
JAZ8	CTGATTCTTCAGATACAACC	GAATGGTACGGTGAAGTAGC	512 pb
OPR3	CTTCTCATGCAGTGTATCAAC	CGTCCAAGTGATCTATAGCTG	404 pb
JAR1	GTTTCATCGGCTGGACAGTTT	TCAAACGCTGTGCTGAAGT	113 pb
MYC2	GTCACCGGTTTATGGAATGA	CGGAAGAGCTCATGAAAGC	103 pb

5.6. Evaluación fenotípica entre plantas *bol-D* y plantas silvestres tratadas con MeJA

Para evaluar la similitud de los fenotipos de raíz y de roseta entre plantas *bol-D* y plantas silvestres a las que se le aplicó MeJA exógeno, se sembraron semillas

de las líneas *bol-D* y su control silvestre Wassiliewskija (Ws) en placas con MeJA 50 μ M y en placas sin hormona como control. A la par de este experimento también se sembraron semillas *drnl-2* y Landsberg *erecta* (Ler) y en los mismos medios con hormona y sin hormona.

Para medir la longitud de la raíz, las semillas fueron sembradas en placas cuadradas con medio MS 0.5x, sacarosa 1% y 1.5% de agar para plantas para evitar que la raíz penetrara en el medio. Para medir el diámetro de la roseta, las semillas se sembraron en medio MS con agar al 1%. Se sembraron 5 placas por tratamiento con 6 semillas por placa. Se tomaron fotos de las placas a los 9, 14 y 19 días después de la germinación (ddg) y las imágenes fueron analizadas con el software Image J.

5.7. Comparación de los fenotipos de órganos florales entre plantas *drnl-2* y plantas mutantes de genes de la ruta de los jasmonatos

Se sembraron en charolas semillas de las líneas *drnl-2*, *coi1-1*, *aos*, *jar1*, *jaz1*, *myc2* y sus controles silvestres (Col-0 y Ler-wt) y se colocaron en invernadero para que crecieran en las mismas condiciones. Aproximadamente a las 5 semanas de edad de las plantas se escogieron 10 flores al azar por genotipo para analizar su fenotipo observándolas en un estereoscopio (Zeiss Stemi 2000-C).

5.8. Expresión de *BOL* en respuesta a la inhibición de síntesis de JA

Se germinaron plantas de la línea *pBOL-GUS* en placas con medio MS. A los 6 ddg se transfirieron 20 plántulas por tratamiento a placas con 250 o 500 μ M de ácido dietil ditiocarbámico (DIECA; Sigma-Aldrich) que es un inhibidor de la ruta de biosíntesis de JA (Farmer *et al.*, 1994). Las plántulas fueron colectadas a las 24, 48 y 72 h después de que fueron transferidas a medio con DIECA y se evaluó la expresión de GUS.

5.9. Aplicación de MeJA a plantas *drnl-2*

Para ver el efecto que causaba la aplicación de MeJA exógeno a inflorescencias de plantas *drnl-2* se realizó un experimento en invernadero. Para esto se tomaron 12 plantas de 4 semanas de edad por charola y 2 charolas de la línea *drnl-2* por cada tratamiento. A las inflorescencias de 8 días de edad (8 días después de la aparición de los botones florales) se aplicaron los siguientes 4 tratamientos: a) MeJA 50 μM + Silwet 200 $\mu\text{M/l}$ por 2 días; b) MeJA 50 μM + Silwet 200 $\mu\text{M/l}$ por 8 días; c) MeJA 500 μM + Silwet 200 $\mu\text{M/l}$ por 2 días; d) MeJA 500 μM + Silwet 200 $\mu\text{M/l}$ por 8 días. A las plantas *drnl-2* que se usaron como control se les aplicó agua destilada + Silwet 200 $\mu\text{M/l}$. Durante los tratamientos y posterior a ellos, se tomaron las flores que se fueron abriendo por 7 días para su observación en un estereoscopio (Zeiss Stemi 2000-C) y cuantificación del número de pétalos, estambres y filamentos.

5.10. Cuantificación de los niveles de jasmonatos en plantas inducibles de la actividad de *BOL*

La extracción y cuantificación de ácido jasmónico se llevó a cabo en el Laboratorio de Ecología de Plantas del Departamento de Ingeniería Genética de Cinvestav-Unidad Irapuato. Para este ensayo se utilizaron rosetas de plantas de *Arabidopsis* de 4 semanas de edad de la línea 35S-*ESR2-ER*. Para este experimento se realizaron los 4 tratamientos siguientes: a) β -estradiol por 48 horas; b) β -estradiol por 96 horas; c) DMSO por 48 horas; y d) DMSO por 96 horas.

El tejido correspondiente a cada tratamiento se congeló en nitrógeno líquido y se molió para obtener 500 mg de tejido fresco por muestra. Por cada tratamiento se realizaron 3 repeticiones. A cada muestra se le agregó 1 ml de acetato de etilo, se mezcló en vórtex y se le agregaron 2 μl de dihidrojasmonato (DHJA) como control interno. Las muestras se dejaron en agitación a 4°C por 24 h. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo y al residuo se le agregaron 500 μl más de acetato de etilo, se dejó en agitación por 30 min y el sobrenadante se mezcló con el anterior para

extraer el resto de ácido jasmónico de la muestra. El solvente se evaporó completamente en un rotavapor y se le agregó a cada muestra 100 µl de N'N' diisopropil-etilamina, 100 µl de cloroformo y 10 µl de PFB-Br (2,3,4,5,6-pentafluorobenzil bromuro) en campana de extracción para el proceso de derivatización y se incubaron los tubos a 60°C por 30 minutos. Los solventes se evaporaron completamente con N₂ gaseoso y las muestras se resuspendieron en 100 µl de metanol grado HPLC para transferirlas a viales para su análisis por GC-EIMS (Gas Chromatography-Electron Ionization Mass Spectrometry) usando el modo SIM ("Single Ion Monitoring"). La separación fue realizada en una columna capilar ultra inerte DB-1 MS (60 m de longitud x 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor del film; comprada de Agilent) usando un cromatógrafo de gases HP-5890A con autoinyector y adaptado a un espectrómetro de masas de cuadrupolo simple de la serie 5890A HP con una fuente de impacto de electrones operando a 70 eV. La corrida del cromatógrafo de gases se realizó bajo el siguiente programa: temperatura inicial 150°C por 3 min, luego una rampa a 4°C por minuto hasta 280°C; esta temperatura se mantuvo constante por 25 min. El volumen de inyección fue 1 µl. Para el análisis y la identificación de compuestos se usó el software AMDIS y la librería NIST-MS 2010. Los iones seguidos por el modo SIM fueron m/z=141, m/z=181 y M+=392 para JA; m/z=141, m/z=181 y M+=394 para DHJA.

5.11. Cruzas con líneas marcadoras de jasmonatos y mutantes de genes de la ruta de los jasmonatos

Se realizaron cruzas de plantas *bol-D*, *drnl-2* y *35S-ESR2-ER* con líneas marcadoras de jasmonatos y mutantes de genes de la ruta de jasmonatos. Para esto se transfirió polen de plantas de una línea (planta padre) al pistilo de la planta de otra línea (planta madre). Posteriormente, las semillas obtenidas de estas cruzas se genotipificaron para obtener plantas homocigotas. Las cruzas realizadas se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Cruzas de plantas mutantes de *BOL* con líneas marcadoras de jasmonatos y mutantes de genes de la ruta de jasmonatos. Las X indican las cruzas que ya se comenzaron a realizar.

	35S-ESR2-ER	<i>drnl-2</i>
<i>pLOX2-GUS</i>	X	X
<i>4xGCC-GUS</i>	X	
<i>Jas9-Venus</i>		
<i>pJaz10-GUSplus</i>	X	X
<i>aos</i>	X	
<i>myc2</i>	X	X
<i>jaz8</i>	X	
<i>coi1</i>		X
<i>opr3</i>		
<i>jar1</i>		X

5.12. Expresión transitoria de *BOL* en línea marcadora de jasmonatos en jitomate

Se cultivó la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* que contenía la construcción *pBOL-BOL-GFP* en el vector pMDC204 en medio LB sólido con kanamicina, rifampicina y ampicilina a 28°C por 2 días. Además, se transformó la bacteria *A. tumefaciens* con el vector pMDC204 vacío para utilizarlo como control negativo (ver el protocolo de transformación para *A. tumefaciens* del apartado *Transformación de la línea Jas9-VENUS* en la página 25. Posteriormente, cada una de las bacterias se transfirió a 5 ml de medio líquido con antibiótico para su crecimiento a 28°C por 1 día más. Se midió la densidad óptica del cultivo para verificar que la bacteria hubiera crecido hasta la saturación (OD >1).

El cultivo se centrifugó a 4,000 rpm por 10 min a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 10 ml de medio de infiltración (10 mM de MgCl₂, 10 mM de MES pH=5.6 y 100 mM de acetosiringona).

Se agitó levemente a temperatura ambiente por al menos 3 horas y se infiltró con una jeringa sin aguja en la parte abaxial de 5 hojas tomadas al azar de 10 plantas de jitomate *JERE-GUS*. Como controles negativos fueron utilizados un cultivo de la bacteria con el vector vacío y medio de infiltración sin bacteria. Las hojas fueron colectadas a los 3 días después de la infiltración y se tiñeron para ver la expresión de GUS.

5.13. Análisis de expresión del gen *JAZ8* en la mutante *jaz8*

Se colectó RNA de plantas mutantes *jaz8* y se sintetizó cDNA, con el que se realizó un PCR con los oligonucleótidos para *JAZ8*, indicados en la Tabla 4. Se empleó el mismo método indicado en el apartado de RT-PCR. Como control positivo se usó cDNA de una planta silvestre, y para el control negativo no se usó cDNA.

5.14. Análisis estadísticos

Para los datos de los experimentos de comparación de fenotipos de las mutantes de *BOL* y plantas silvestres con y sin MeJA, la aplicación exógena de MeJA a inflorescencias de mutantes de pérdida de función de *BOL* y cuantificación de JA en plantas inducibles de *BOL*, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de diferencias mínimas significativas (LSD) para identificar los grupos estadísticos en los casos donde el ANOVA resultó significativo ($p < 0.05$). Para el análisis se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI Versión 16.2.04.

6. RESULTADOS

6.1. OBJETIVO 1. Verificar el cambio en la expresión de los genes de JA en las mutantes de *BOL*

Como primer objetivo, se buscó confirmar, mediante RT-PCR, los cambios en expresión de algunos genes de la ruta de jasmonatos en plantas mutantes o con actividad alterada del factor de transcripción. Se evaluaron los genes *JAZ8*, *OPR3*, *JAR1* y *MYC2* en la parte aérea de plantas de *Arabidopsis* de las líneas *bol-D*, *drnl-2* y *35S-ESR2-ER*. Como muestra la Figura 9, el nivel de transcritos de los genes *JAR1*, *OPR3* y *MYC2* no se incrementó en la parte aérea de ninguna de las mutantes de *BOL* al tiempo analizado, ni en la línea inducible después de 30 min y 8 horas de inducción. Sin embargo, el nivel de transcrito del gen *JAZ8* se observó claramente aumentado después de 30 minutos y 8 horas de inducción con β -estradiol en la línea inducible de *BOL*. Por otro lado, no se observó presencia del transcrito en la línea *bol-D*. En conclusión, podemos ver que *JAZ8* está sobreexpresado a 30 min y 8 horas de inducción de *BOL*, pero reprimido cuando *BOL* está expresado constitutivamente por tiempos largos.

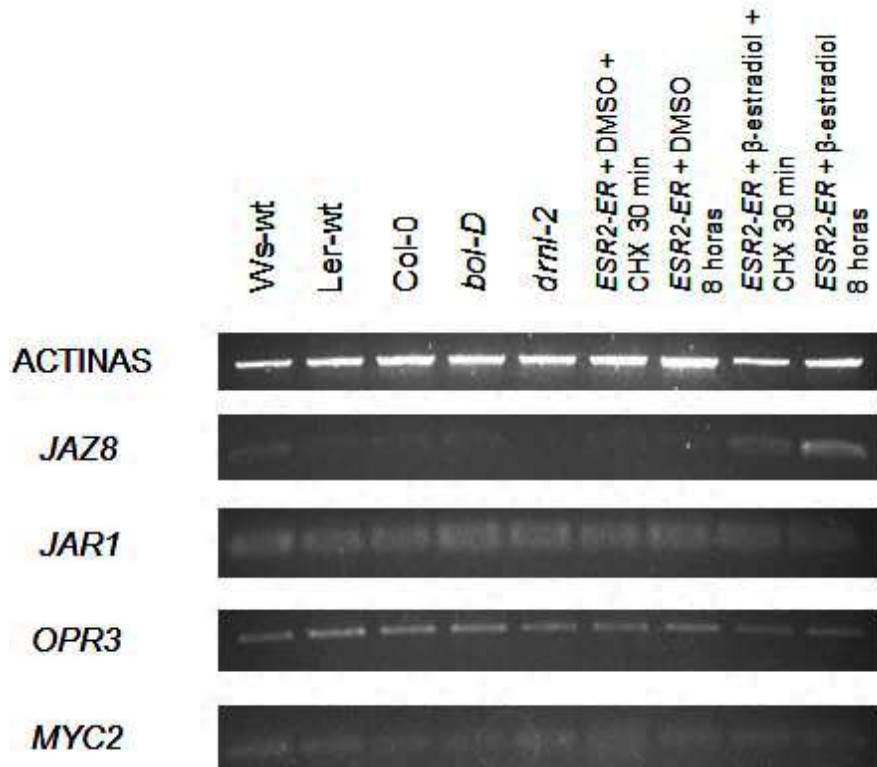


Figura 9. RT-PCR de genes de jasmonatos en mutantes de *BOL*.

6.2. OBJETIVO 2. Comparar los fenotipos de las mutantes de *BOL* y JA y los tratamientos con MeJA, en las mismas condiciones y tiempos de desarrollo

El fenotipo de las mutantes de ganancia y pérdida de función del gen *BOL*, parecía similar al fenotipo reportado en publicaciones. Las mutantes de ganancia de función parecían compartir la reducción de tamaño con plantas tratadas con jasmonatos, mientras que las mutantes de pérdida de función parecían tener características similares a mutantes afectadas en la biosíntesis o percepción de jasmonatos.

Con el fin de comparar si los fenotipos eran efectivamente similares y hasta qué punto lo eran, se procedió a realizar los siguientes experimentos:

6.2.1. Evaluación fenotípica de plantas *bol-D*, *drnl-2* y plantas silvestres tratadas con MeJA

Debido a las similitudes observadas entre el fenotipo de las plantas *bol-D* y el fenotipo reportado para plantas silvestres tratadas con MeJA en el trabajo de Noir *et al.* (2013) se procedió a observar plantas silvestres (*Ws-wt*) y *bol-D* tratadas con MeJA en las mismas condiciones de crecimiento para comprobar la similitud de fenotipos. Se pudo observar que a los 9, 13 y 19 ddg las raíces de las plantas *bol-D* y de las plantas *Ws-wt* tratadas con 50 μ M de MeJA tenían una longitud similar. La similitud en longitud de las raíces de plantas silvestres tratadas con MeJA y de *bol-D*, podría sugerir que el fenotipo de raíces cortas de esta última podría deberse a un incremento en el contenido, sensibilidad o respuesta a dicha hormona (Figura 10 A, C, F). Además, el porcentaje de disminución de longitud de las raíces de plantas *bol-D* y *Ws-wt* a los 19 días sugieren que la mutante *bol-D* es más responsiva a jasmonatos que la planta silvestre en esta etapa al menos (Figura 10 E).

Por otro lado, al contrario de la mutante de ganancia de función que presenta una reducción en la longitud de su raíz, la mutante de pérdida de función mostró una longitud de raíz mayor que la silvestre a los 9 y 13 días (Figura 10 B y D). Al ser tratada con jasmonatos, su longitud se redujo, acercándose más a la longitud de la silvestre (Figura 10 y D). Además, resulta interesante que la mutante de pérdida de función presentó un porcentaje de reducción menor que la silvestre a los 9, 13 y 19 ddg, observándose una reducción de la longitud del 15.16% en raíces de plantas *drnl-2* en comparación con una reducción del 35.55% en plantas silvestres a los 9 ddg (Figura 10 B), 14.02% en plantas *drnl-2* y un 34.29% en plantas silvestres a los 13 ddg (Figura 10 D), y 13.94% en las plantas *drnl-2* y un 27.69% en plantas

silvestres (Figura 10 F). Esto también sugiere que el contenido, sensibilidad (percepción o señalización) o la respuesta a jasmonatos podría estar afectada en la mutante de pérdida de función.

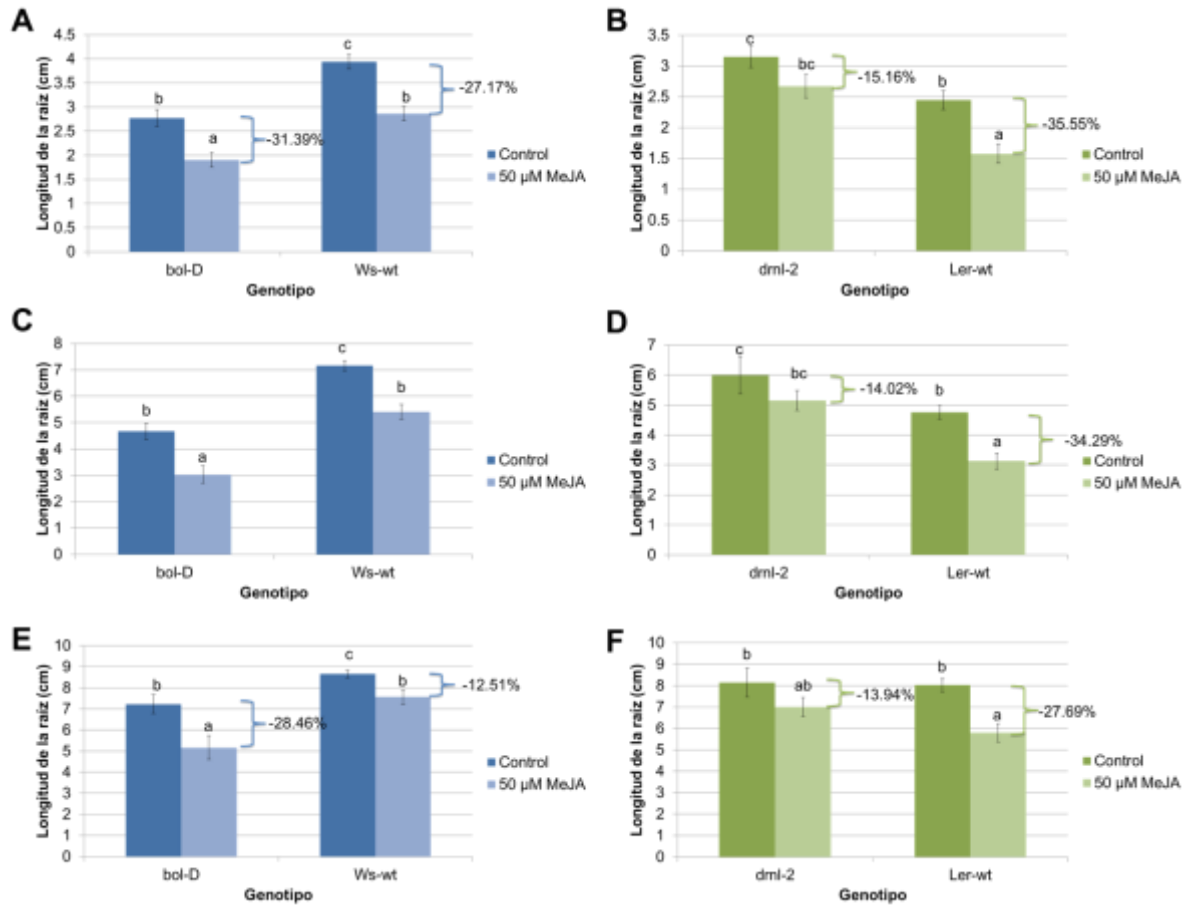


Figura 10. Longitud de raíces de 9 (A, B), 13 (C, D) y 19 (E, F) ddg de las líneas *bol-D*, *Ws wt* (A, C, E), *dml-2* y *Ler wt* (B, D, F) con 50 μ M de MeJA y sin hormona. Las letras sobre las barras representan diferencias significativas (ANOVA $p < 0.05$, LSD test, $n = 15-25$).

Con respecto al tamaño de las rosetas, también se observó una reducción de su diámetro al aplicar el MeJA. Las rosetas de las plantas silvestres a las que se les aplicó el MeJA tuvieron un tamaño similar a las rosetas de las plantas *bol-D* (Figura 11).

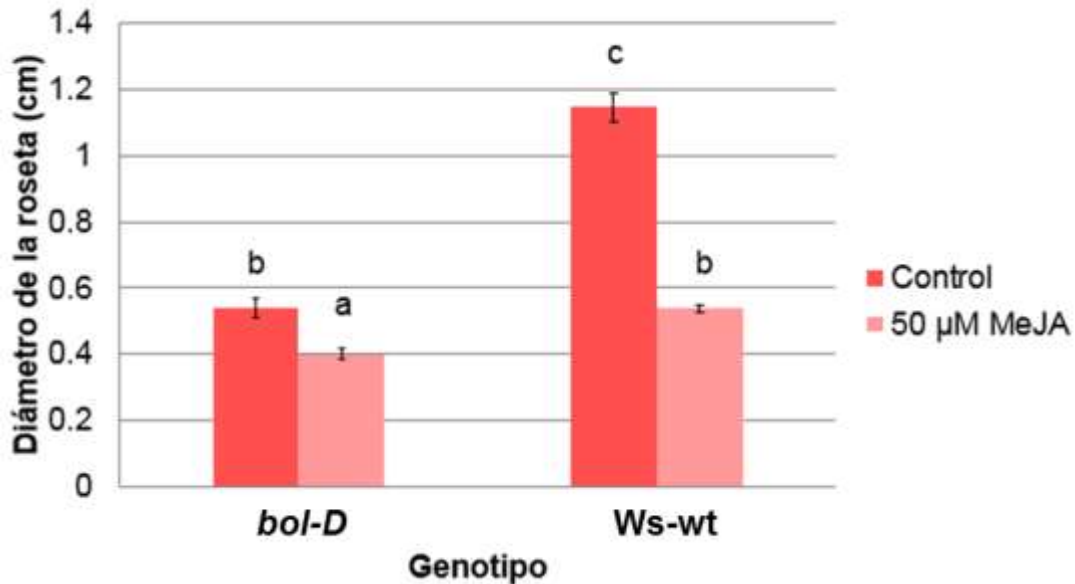


Figura 11. Diámetro de rosetas de 14 ddg de las líneas *bol-D* y *Ws wt* con 50 μM de MeJA y sin hormona. Las letras sobre las barras representan diferencias significativas (ANOVA $p < 0.05$, LSD test, $n = 25$).

Esto nuevamente podría sugerir, que la reducción del tamaño de la roseta de la mutante *bol-D* podría deberse a un incremento en algunos de los pasos de la ruta de jasmonatos. Sin embargo, a pesar de la reducción del tamaño de las rosetas en las plantas silvestres al aplicar MeJA no se pudo observar el fenotipo característico de las plantas *bol-D*, que es la curvatura de las hojas, sino que simplemente las plantas redujeron su tamaño (Figura 12), indicando que otros aspectos del fenotipo se deben probablemente a alteraciones en otros procesos.

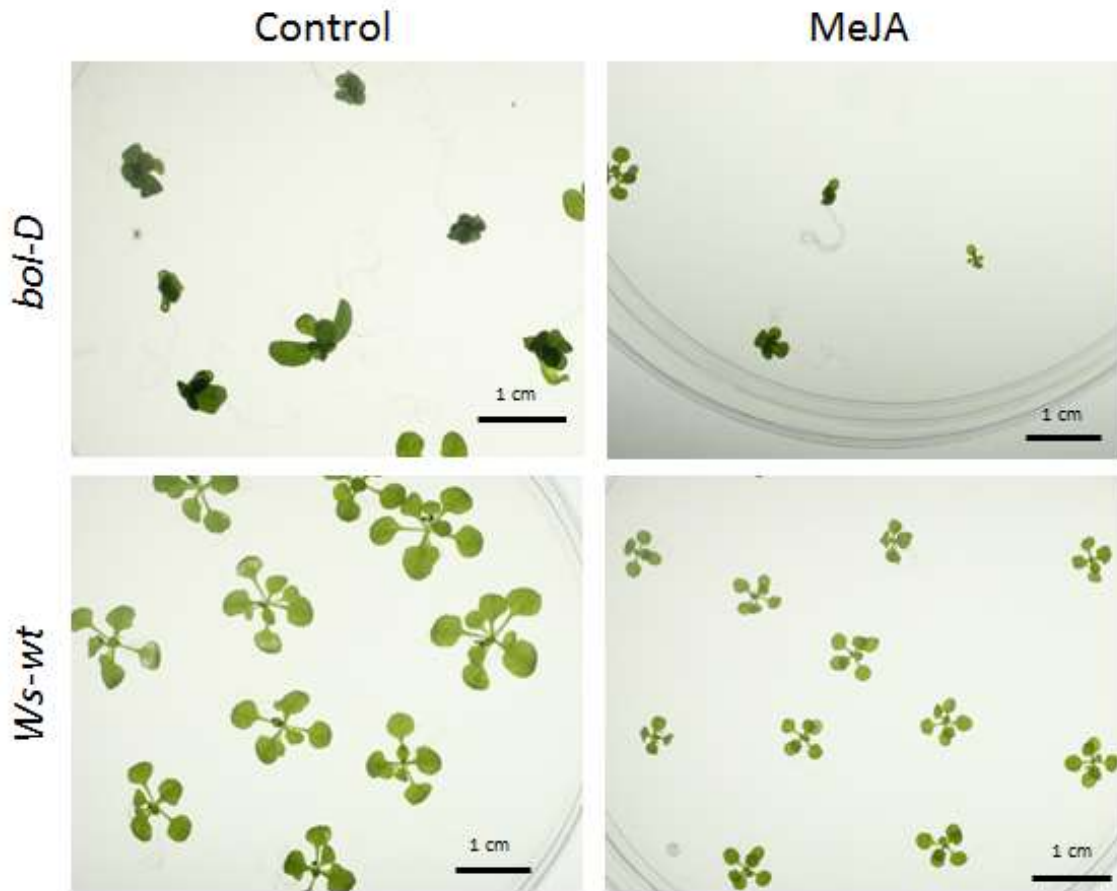


Figura 12. Rosetas de plantas *bol-D* y *Ws wt* con 50 μ M de MeJA y sin hormona.

En conclusión, el tratamiento con MeJA afectó el tamaño de plantas silvestres, reduciendo el tamaño de la raíz y roseta de las plantas silvestres hasta una tamaño comparable con el de las raíces y rosetas de las plantas *bol-D*, sugiriendo que este aspecto del fenotipo de la mutante podría estar relacionado con jasmonatos.

6.2.2. Comparación de los fenotipos de órganos florales entre plantas *drnl-2* y plantas mutantes de genes de la ruta de los jasmonatos

Al observar que los tratamientos de jasmonatos provocaban algunos efectos comparables a la sobreexpresión del gen, específicamente la reducción de tamaño, buscamos corroborar si las mutantes de pérdida de función, en efecto tenían algunas características similares a mutantes afectadas en la biosíntesis o percepción de jasmonatos, como parecían indicarlo las imágenes en las publicaciones de dichas mutantes (Qi *et al.*, 2015).

Se evaluaron 5 diferentes mutantes de genes de la vía de jasmonatos (*aos*, *coi1*, *jaz1*, *jar1* y *myc2*), de las cuales se pudo observar un defecto evidente en el fenotipo de las flores en la mutante *coi1*. En estas flores el desarrollo de estambres y pétalos se vio alterado, y al compararlas en las mismas condiciones, sus defectos parecían similares a los observados en la mutante *drnl-2* (Figura 13).

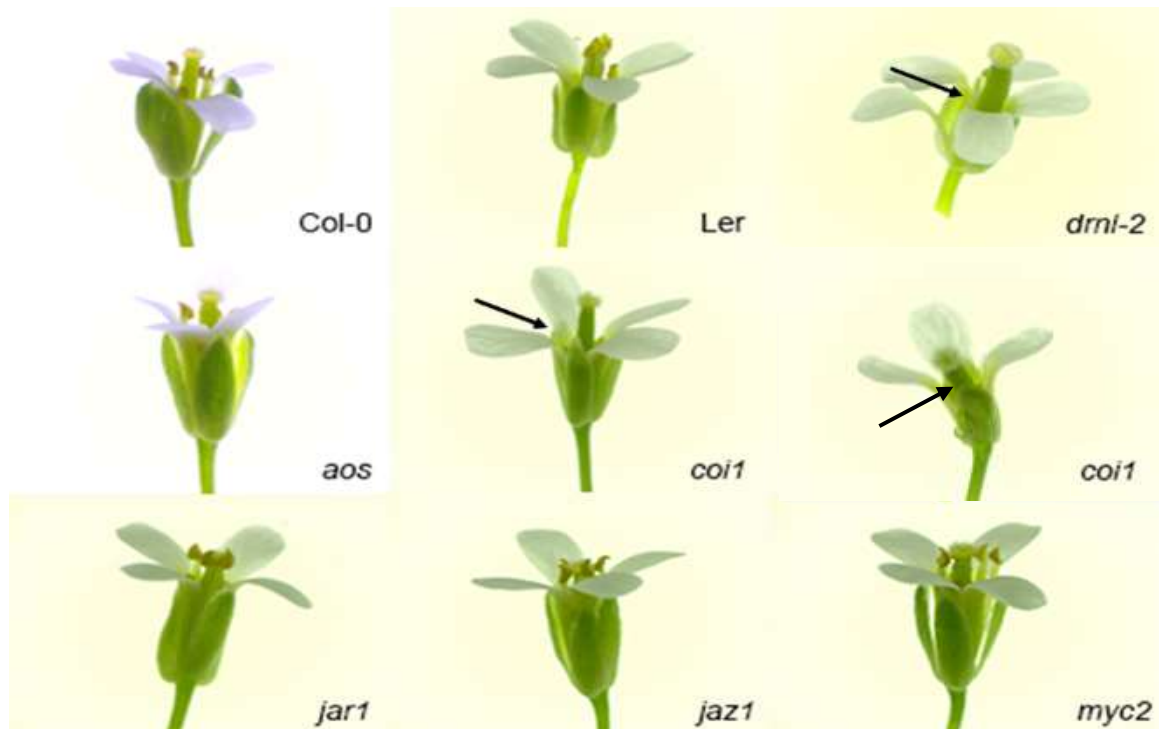


Figura 13. Comparación de los fenotipos de flores de plantas mutantes en genes de jasmonatos y la mutante de pérdida de función de *BOL* (*drnl-2*). Las flechas indican defectos en los órganos reproductivos.

La similitud de los defectos observados en órganos reproductivos en la mutante de pérdida de función de *BOL* y plantas con sensibilidad reducida a JA, sugieren que la pérdida de función del gen afecta la ruta de jasmonatos, o que el gen actúa como un efector de la ruta de jasmonatos.

6.3. OBJETIVO 3. Evaluar si la aplicación exógena de JA complementa el fenotipo alterado de la mutante pérdida de función

Para evaluar la posibilidad de que el fenotipo de la mutante *drnl-2*, ocasionado por la pérdida de función del gen *BOL*, se debiera a una deficiencia de jasmonatos, analizamos si dicho fenotipo podía ser recuperado con la aplicación de MeJA. Para esto se realizó un experimento en el cual se aplicó MeJA a plantas *drnl-2*. Se utilizaron 24 plantas de 4 semanas de edad por tratamiento, con inflorescencias 8 días después de emerger, para poder evaluar cómo afectaba el MeJA en los diferentes tejidos y etapas florales. Además, se evaluó la aplicación de dos concentraciones de MeJA (50 y 500 μM) y la aplicación de MeJA por 2 y 8 días.

Realizando el conteo de los pétalos, filamentos y estambres de todas las flores recolectadas en el experimento se pudo observar que con el tratamiento de 2 días de aplicación de MeJA hubo una diferencia en el número de estambres de acuerdo a la concentración de MeJA aplicada, observándose una mayor recuperación del número de estambres con la concentración de 50 μM de MeJA (Figura 14 C). En el caso de los tratamientos con MeJA por 8 días el número de filamentos de la mutante aumentó, observándose una mayor recuperación con el tratamiento de 500 μM de MeJA (Figura 14 E), mientras que en el caso de los estambres la mayor recuperación se observó con el tratamiento de 50 μM de MeJA (Figura 14 F).

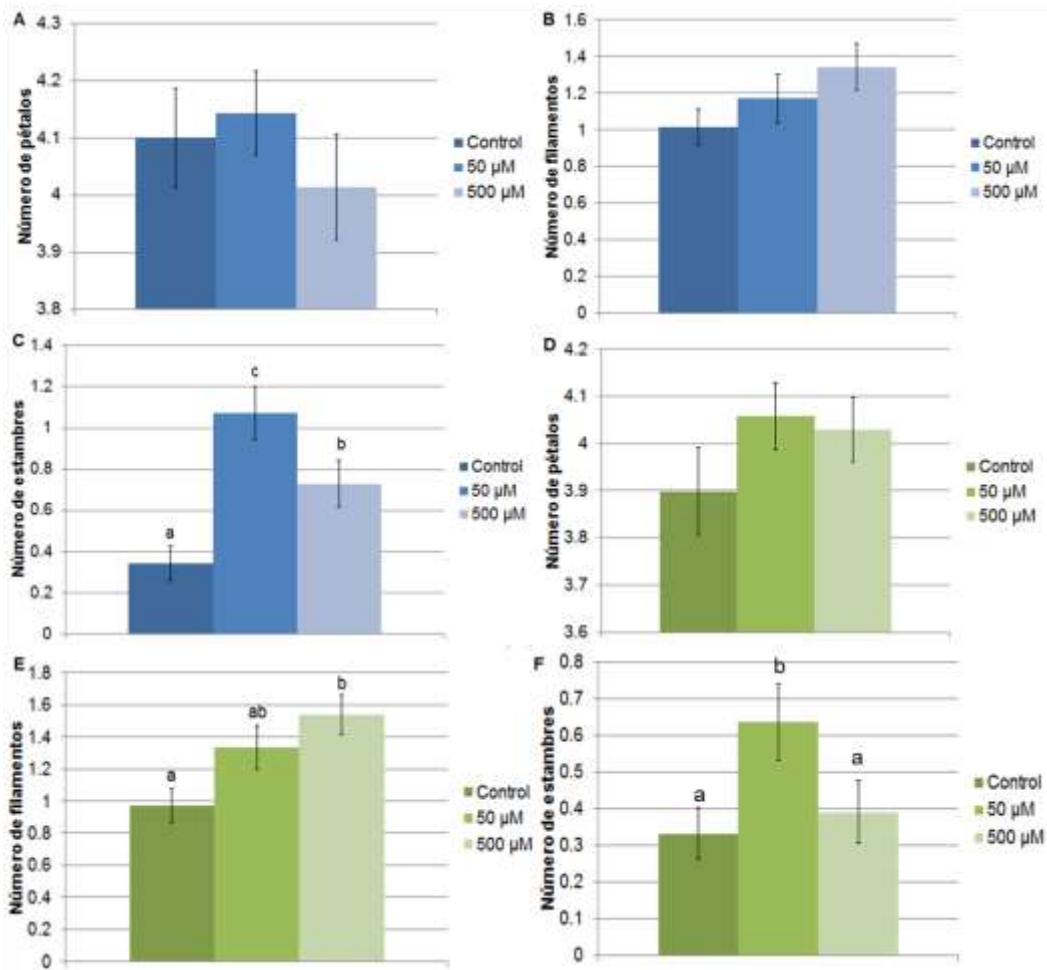


Figura 14. Número de pétalos (A, D), filamentos (B, E) y estambres (C, F) de plantas *drnl-2* después de 2 (A-C) y 8 (D-F) días de aplicación de MeJA. Las letras sobre las barras representan diferencias significativas (ANOVA $p < 0.05$, LSD test. $n = 70$)

Además, debido a que las flores analizadas en este experimento fueron recolectadas en diferentes días, lo que significa que estaban en diferente etapa de desarrollo floral al recibir los tratamientos, se analizó la recuperación del fenotipo de las plantas *drnl-2* en cada día.

Para el número de pétalos parece que no hubo diferencia entre los tratamientos con MeJA y el control sin hormona después de los 2 periodos de aplicación de MeJA (Figura 15).

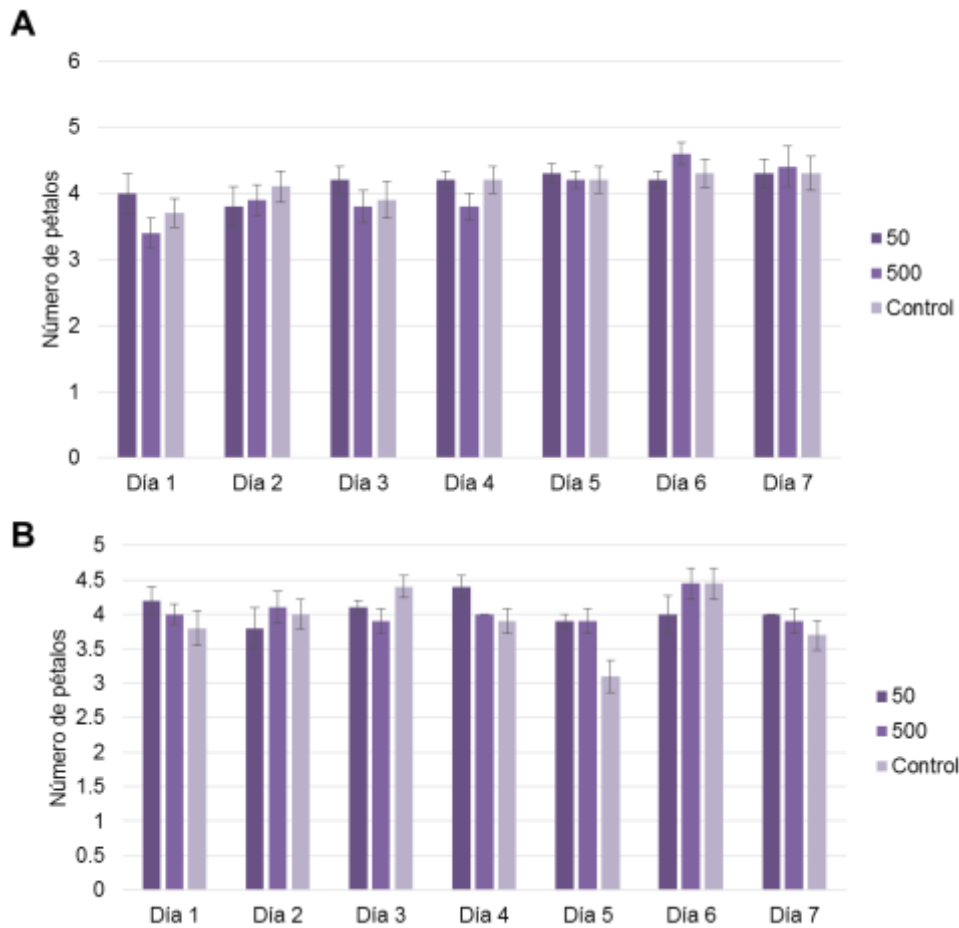


Figura 15. Número de pétalos de flores *drml-2* abiertas durante 7 días después de la aplicación de 50 y 500 μM de MeJA por 2 (A) y 8 (B) días. $n=5$.

Para el número de filamentos se observó una clara recuperación parcial del fenotipo el día 4 después del tratamiento en el que solamente se aplicó MeJA por 2 días, además se observó mejor la recuperación con el tratamiento de 50 μM de MeJA (Figura 16 A). Por otro lado, en el tratamiento donde se aplicó MeJA por 8 días hubo una mejor recuperación con el tratamiento de 500 μM (Figura 16 B).

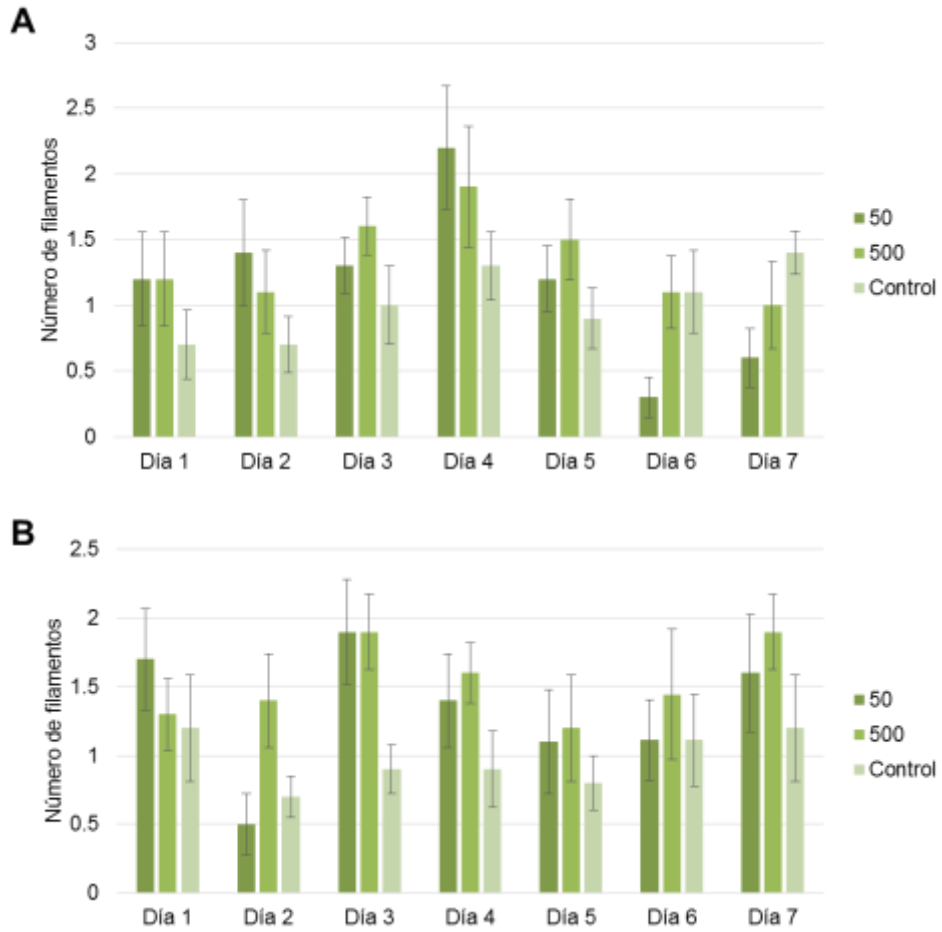


Figura 16. Número de filamentos de flores *drnl-2* abiertas durante 7 días después de la aplicación de 50 y 500 μ M de MeJA por 2 (A) y 8 (B) días. n=5.

El número de estambres también se vio recuperado parcialmente en ambos tiempos de aplicación de MeJA, aunque en el tratamiento de 2 días de aplicación la recuperación fue mejor a partir del día 3 del tratamiento (Figura 17 A), y en el tratamiento de 8 días de aplicación la recuperación se observó el día 5 y 6 del tratamiento (Figura 17 B).

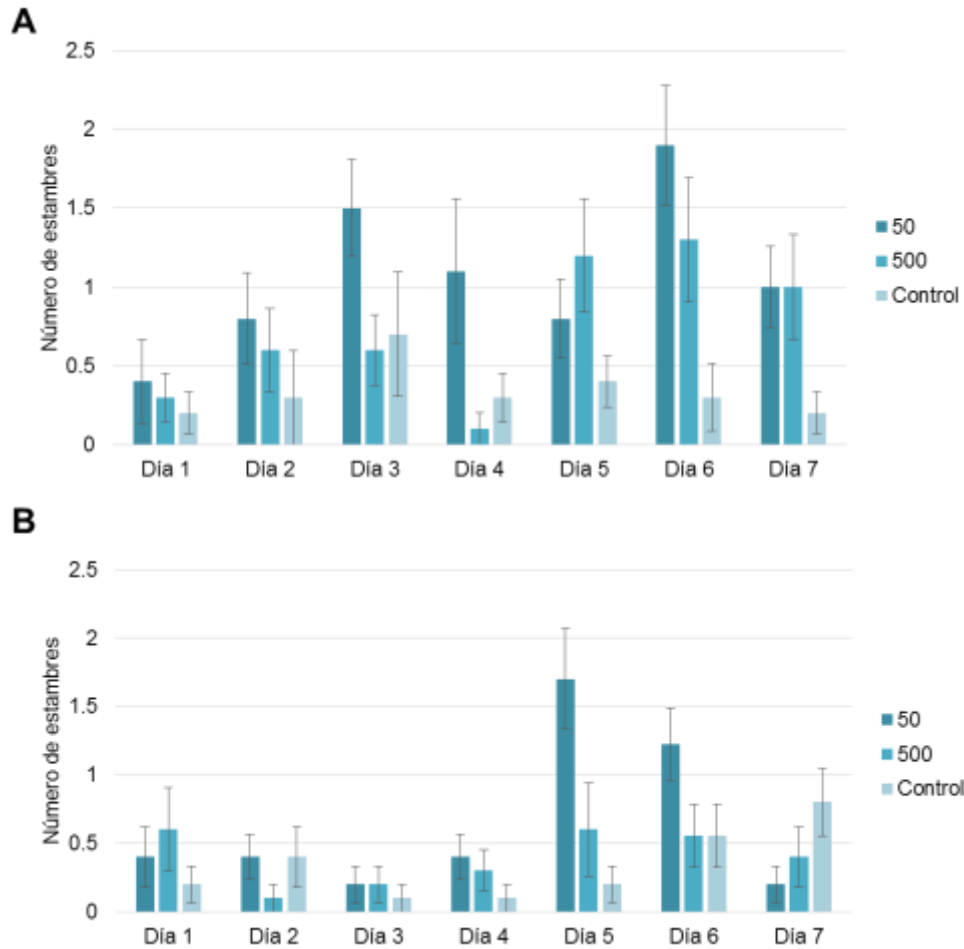


Figura 17. Número de estambres de flores *drnl-2* abiertas durante 7 días después de la aplicación de 50 y 500 μ M de MeJA por 2 (A) y 8 (B) días. n=5.

En conclusión, la aplicación exógena de MeJA recuperó parcialmente el fenotipo de la mutante de pérdida de función de *BOL*, sugiriendo que el fenotipo podría deberse parcialmente a una disminución en el contenido de jasmonatos.

6.4. OBJETIVO 4. Conocer si el nivel de jasmonatos está afectado en plantas donde se induce la actividad de *BOL*

Los fenotipos de las plantas con ganancia de función del gen *BOL* compartían algunas características con plantas tratadas con jasmonatos, y las mutantes de

pérdida de función compartían características con plantas con niveles reducidos de jasmonatos. Aunado a esto, se observó una recuperación parcial del fenotipo de los estambres y los filamentos de la mutante de pérdida de función al aplicar jasmonatos exógenamente.

Esto sugería que al menos algunos de los fenotipos morfológicos que mostraron las plantas sobreexpresantes, podrían deberse a un nivel de jasmonatos incrementado. Además, experimentos realizados anteriormente en la mutante de ganancia de función y plantas sobreexpresantes, indicaron que efectivamente los niveles de jasmonatos eran más altos en ellas (Durán-Medina, 2013). Sin embargo, este incremento podría ser debido a una acumulación paulatina de jasmonatos ante el estrés del desarrollo alterado de dichas plantas. Por ello, para saber si el aumento del nivel de jasmonatos se debía al efecto del gen, y no al estrés del desarrollo, se empleó la línea inducible *35S-ESR2-ER*. Para realizar este experimento se cuantificó el ácido jasmónico de plantas de 4 semanas de edad de la línea *35S-ESR2-ER* inducidas y sin inducir a 48 y 96 horas después de la aplicación del β -estradiol y DMSO (el vehículo en el cual se disuelve el β -estradiol), respectivamente.

Como muestra la Figura 18, se pudo observar que a los dos días de inducción, no hubo un cambio evidente en el contenido de JA en las plantas. Sin embargo, cuatro días después de la inducción del factor de transcripción, el incremento en el nivel de JA fue muy notorio.

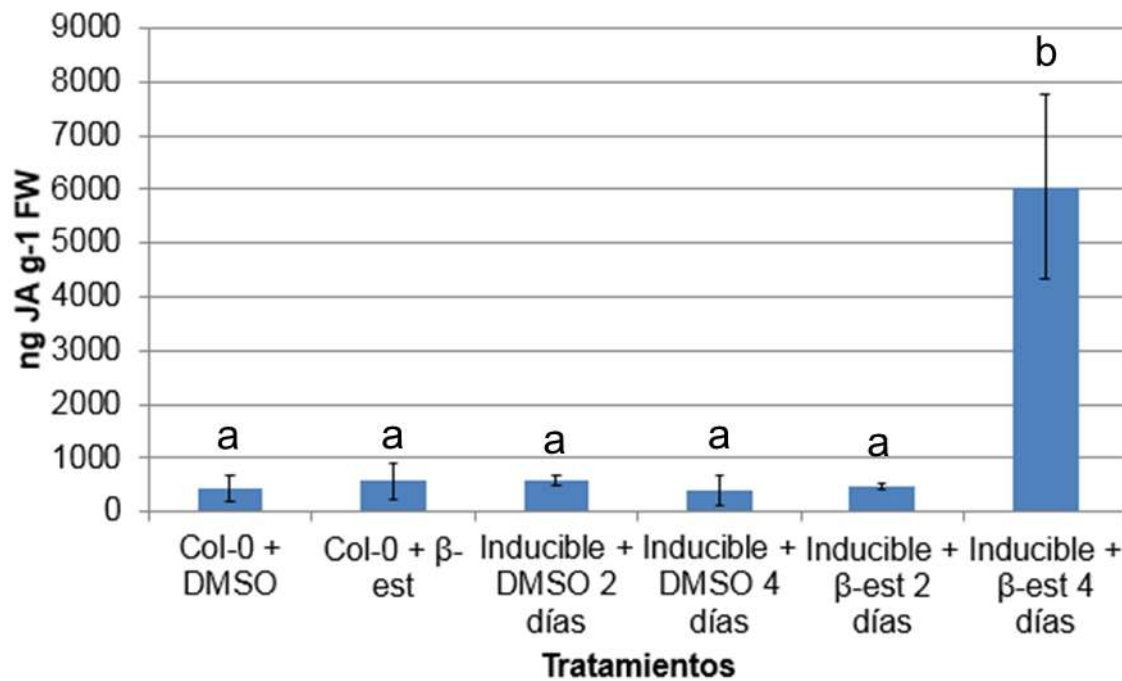


Figura 18. Concentración de ácido jasmónico (ng de ácido jasmónico por gramo de peso fresco) en plantas silvestres e inducibles de *BOL* (*35S-ESR2-ER*) con y sin inductor (DMSO). Las letras sobre las barras indican diferencias significativas (ANOVA $p < 0.05$, LSD test, $n=3$).

Por lo tanto, podemos concluir que después de 4 días de inducir la actividad del gen *BOL* se puede ver un aumento en la acumulación de ácido jasmónico, sugiriendo que el factor de transcripción *BOL* promueve su acumulación.

6.5. OBJETIVO 5. Evaluar la respuesta del gen *BOL* a perturbaciones en la ruta de JA

Los experimentos anteriores sugerían que la alteración de la función de *BOL* afectaba también, directa o indirectamente, a la ruta de jasmonatos. Para saber si también esta fitohormona a su vez podía afectar la expresión del gen se utilizó la línea marcadora *pBOL-GUS* para evaluar la expresión del gen *BOL* ante la

disminución de jasmonatos. Para esto se utilizó un compuesto que ha sido reportado como inhibidor de la biosíntesis de jasmonatos (Farmer *et al.*, 1994). Para el experimento, plántulas de 6 ddg de la línea *pBOL-GUS* se transfirieron a medio de cultivo con 250 o 500 μM de DIECA por 24, 48 y 72 horas para después someterlos a una tinción de GUS y observar el cambio en el dominio de expresión del gen *BOL*.

Como se puede observar en las Figuras 19, 20 y 21, el dominio de expresión de *BOL*, el cual normalmente se observa en la zona de formación de los primordios foliares y la región apical de las raíces laterales, se expandió en las raíces cuando las plantas marcadoras de *BOL* (*pBOL-GUS*) se sometieron a 250 μM del inhibidor de la ruta de los jasmonatos DIECA (Farmer *et al.*, 1994). La expansión se observó a las 24, 48 y 72 horas de exposición a DIECA, y fue más evidente a más horas de exposición a DIECA. Con DIECA 500 μM el dominio de expresión también se expandió a las 48 horas de tratamiento, pero fue menos evidente que con 250 μM .

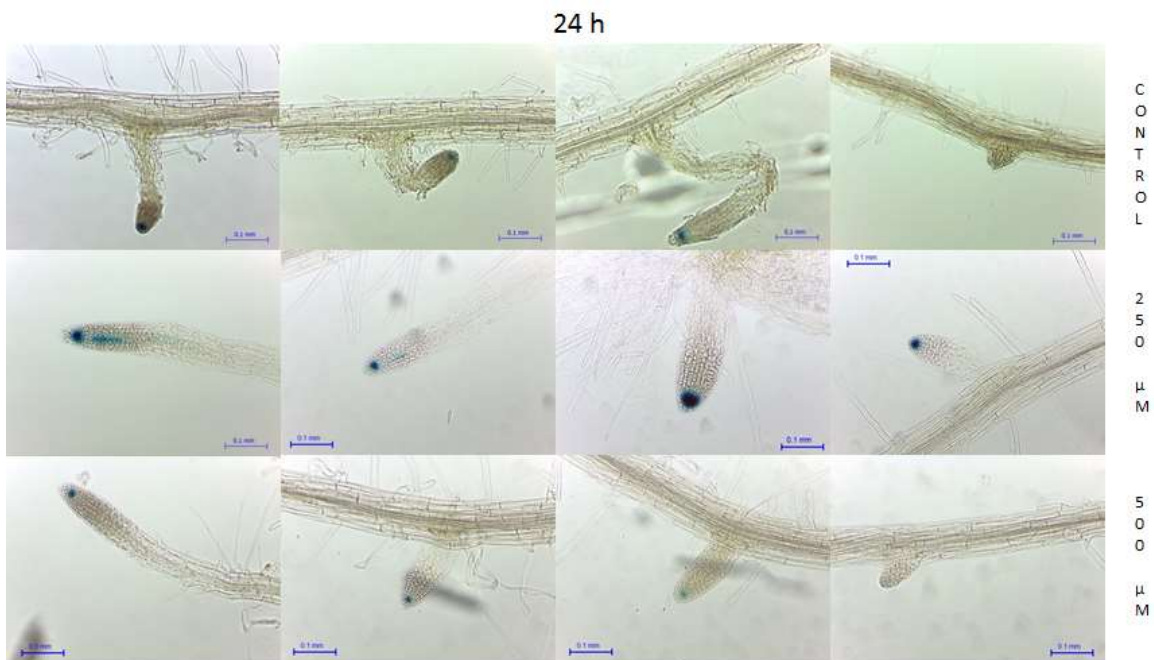


Figura 19. Expresión de *BOL* en raíces secundarias a las 24 horas de exposición a DIECA.

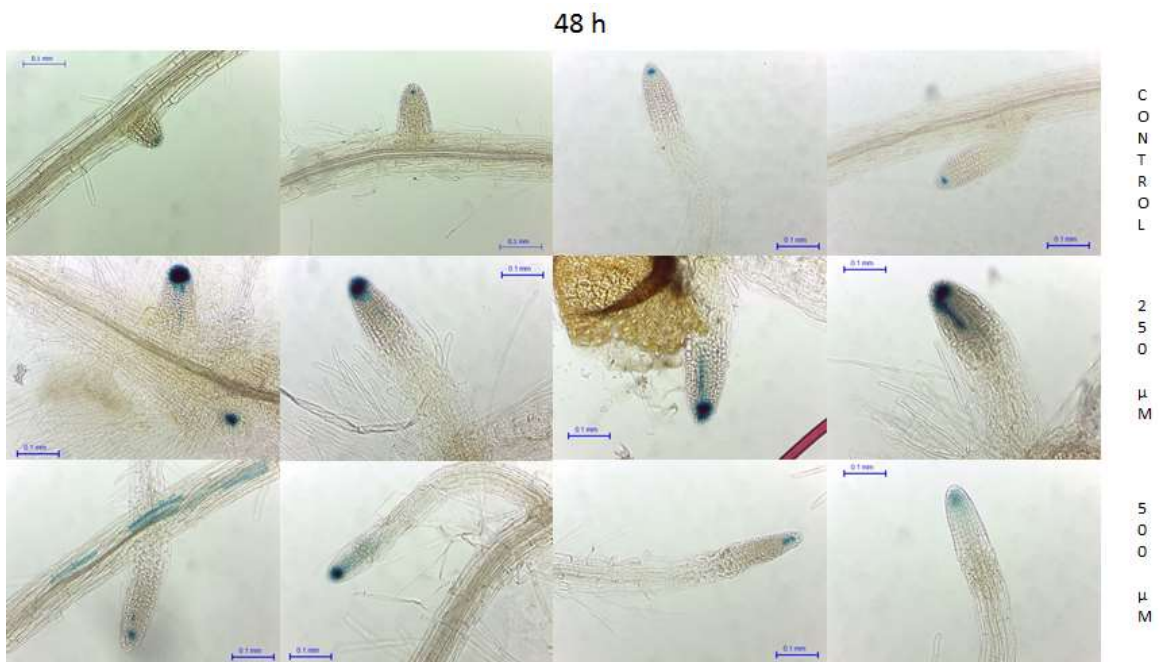


Figura 20. Expresión de *BOL* en raíces secundarias a las 48 horas de exposición a DIECA.

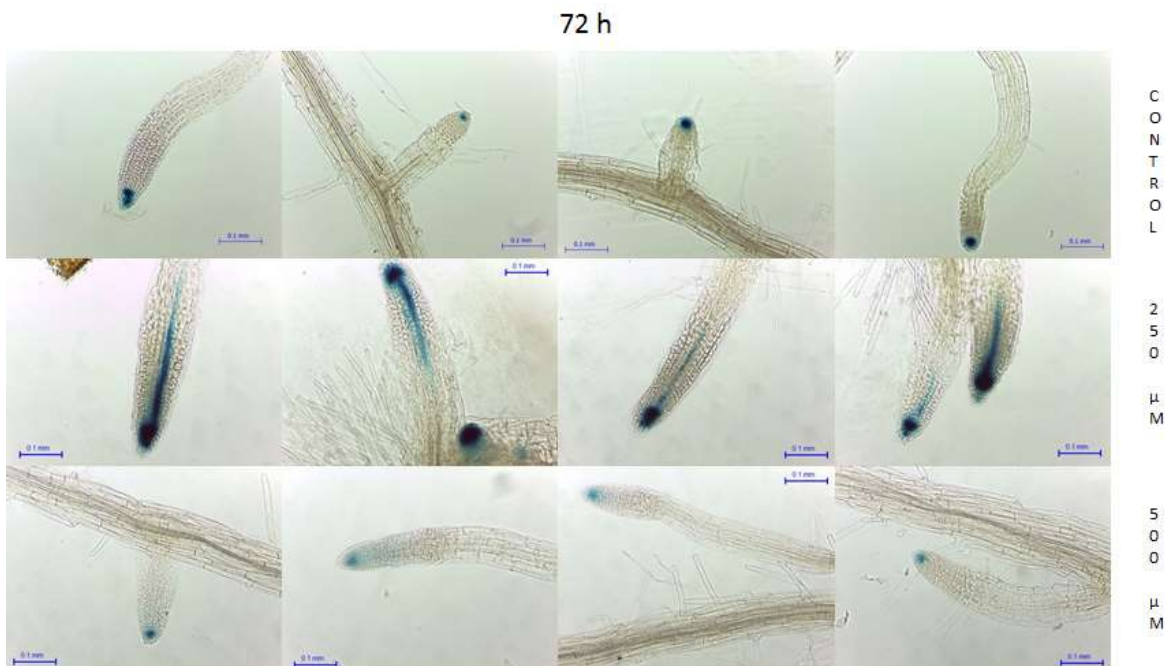


Figura 21. Expresión de *BOL* en raíces secundarias a las 72 horas de exposición a DIECA.

Una observación importante que se pudo realizar en este experimento, fue que al exponer la planta marcadora de *BOL* al inhibidor de la síntesis de jasmonatos, se presentaba una expresión ectópica de *BOL* en células de la epidermis de la zona diferenciada de la raíz principal, a las 24, 48 y 72 horas de exposición a DIECA (Figuras 22, 23 y 24), tanto a 250 como a 500 μ M.

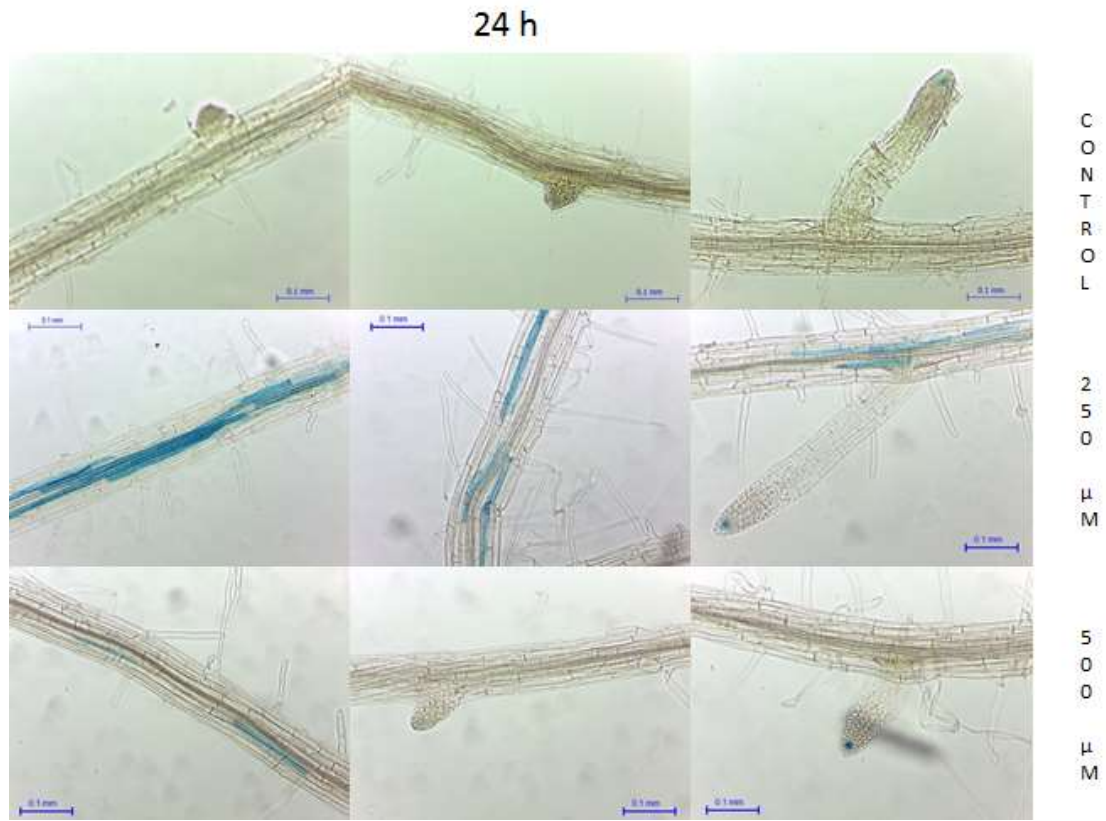


Figura 22. Expresión de *BOL* en la raíz principal a las 24 horas de exposición a DIECA.



Figura 23. Expresión de *BOL* en la raíz principal a las 48 horas de exposición a DIECA.



Figura 24. Expresión de *BOL* en la raíz principal a las 72 horas de exposición a DIECA.

En conclusión, una alteración del nivel de jasmonatos en las plantas afecta la expresión del gen *BOL*, ocasionando una expansión en su dominio de expresión y una expresión ectópica en células de la epidermis de la raíz. Esto sugiere que los jasmonatos reprimen la expresión de *BOL* en la raíz de *Arabidopsis*.

6.6. OBJETIVO 6. Evaluar el cambio en la expresión de líneas marcadoras de JA al inducir, aumentar o reducir la expresión del gen *BOL*

Ya que habíamos observado que la inducción de la actividad de *BOL* provocaba un cambio en la acumulación de JA, se decidió evaluar el cambio en la expresión de líneas marcadoras de JA al inducir, aumentar o reducir la expresión del gen *BOL*. Para esto se siguieron diferentes estrategias experimentales, algunas que únicamente se iniciaron, como las cruzas de mutantes de genes de JA con líneas mutantes del gen *BOL*, y otras de las que se lograron obtener conclusiones, como la expresión transitoria del gen *BOL* en una línea marcadora de jasmonatos en jitomate.

6.6.1. Expresión transitoria de *BOL* en línea marcadora de jasmonatos en jitomate

Debido a que ya se habían observado cambios en el nivel de JA al inducir la actividad de *BOL*, se buscó ver la respuesta de la línea *JERE-GUS*, la cual sirve para evaluar la respuesta de la planta a los jasmonatos, al expresar transitoriamente el gen *BOL*. Se realizó el experimento de expresión transitoria de *BOL* por medio de agroinfiltración a 5 hojas elegidas al azar de 10 plantas de jitomate *JERE-GUS*. Para esto se hicieron 3 tratamientos diferentes: infiltración solamente del medio de infiltración, infiltración de la bacteria con el vector vacío e infiltración de la bacteria con el vector con la construcción *pBOL-BOL-GFP*. Tres días después de la infiltración, se pudo observar que al infiltrar la bacteria que contenía el vector con la construcción *pBOL-BOL-GFP* la expresión de GUS disminuía, a comparación de los

controles con la bacteria con el vector vacío y el medio de infiltración sin bacteria (Figura 25).

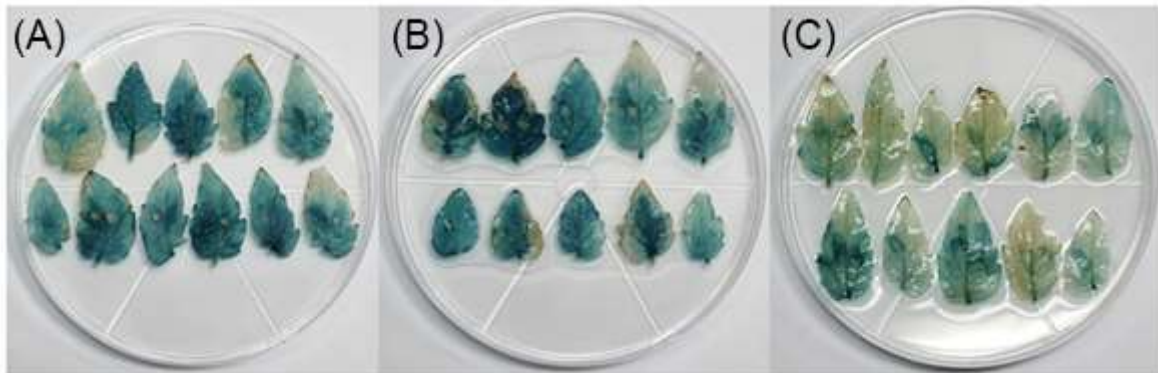


Figura 25. Expresión en línea marcadora *JERE-GUS* de jitomate tres días después de la agroinfiltración. (A) Infiltración solamente del medio de infiltración. (B) Infiltración de *A. tumefaciens* con vector pMDC204 vacío. (C) Infiltración de *A. tumefaciens* con vector con construcción *pBOL-BOL-GFP*.

Por lo tanto, la expresión del gen *BOL* pareció disminuir la respuesta de jasmonatos a los tiempos evaluados (tres días).

6.6.2. Cruzas con líneas marcadoras de jasmonatos

Para complementar esta información en el futuro, se iniciaron cruzas de mutantes de *BOL* con líneas marcadoras de jasmonatos, y se espera que mostrarán resultados interesantes sobre cómo el gen *BOL* puede afectar la respuesta de las plantas a jasmonatos. Se planteó realizar cruzas de las líneas inducibles y de pérdida de función de *BOL* con las líneas marcadoras *pLOX2-GUS*, *4xGCC-GUS*, *Jas9-VENUS* y *pJAZ10-GUSplus*.

Durante este trabajo se avanzó en las cruzas que se muestran en la Tabla 6 marcadas con una X.

Tabla 6. Cruzas de plantas mutantes de *BOL* con líneas marcadoras de jasmonatos. Las X indican las cruzas que ya se comenzaron a realizar.

	35S-ESR2-ER	<i>drnl-2</i>
<i>pLOX2-GUS</i>	X	X
4xGCC-GUS	X	
<i>Jas9-Venus</i>		
<i>pJaz10-GUSplus</i>	X	X

Todas las cruzas que se comenzaron a realizar se encuentran en la fase de genotipificación. Como avance se ha obtenido la F1 de las cruzas. Para su genotipificación posterior, para las cruzas con la línea inducible se realizará un PCR para buscar el promotor 35S y para las cruzas con la mutante de pérdida de función se buscarán las plantas que tengan el fenotipo de la mutante. Además, para las plantas con GUS se realizará la tinción histológica y para la línea con VENUS se buscará la fluorescencia en microscopio confocal.

6.6.3. Transformación de la línea *Jas9-VENUS*

Según lo reportado por Larrieu *et al.* (2015), la línea *Jas9-VENUS* es una herramienta para monitorear la percepción de los jasmonatos biológicamente activos en la planta. En el presente trabajo se planeó utilizar esta línea para realizar una cruce con plantas sobreexpresantes y de pérdida de función del gen *BOL*. Debido a que no se contaba con las líneas, pero se pudo obtener el plásmido con la construcción *Jas9-VENUS*, se procedió a transformar plantas de *Arabidopsis* silvestres.

En la primera selección se encontraron 3 líneas transformantes, las cuales se transfirieron a tierra para continuar con su desarrollo. La progenie de estas plantas se sembró en placas con medio MS para observar la raíz en microscopio

confocal. La expresión de *VENUS* se observó en los núcleos de las células de la raíz, como reportan Larrieu *et al.* (2015), en el 100% de la progenie de 2 de las 3 líneas transformantes, aunque en diferentes intensidades (Figura 26). Las plantas en las que se observó mayor intensidad de la señal de *VENUS* se colocaron en tierra para posteriormente colectar semilla y poder tener material para realizar las cruces.

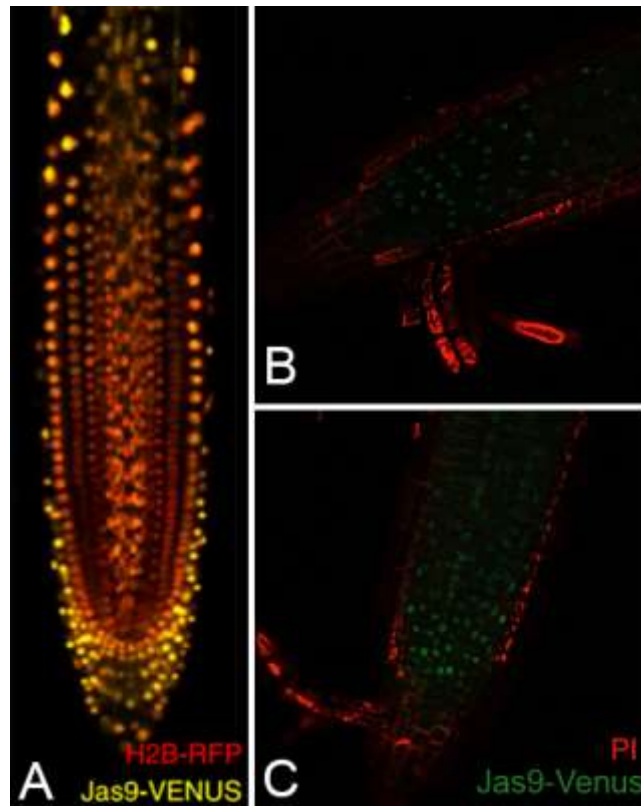


Figura 26. Líneas transformantes *Jas9-VENUS*. (A) Micrografía confocal de la línea *Jas9-VENUS* reportada por Larrieu *et al.* (2015). (B y C) Micrografías confocales de las líneas *Jas9-VENUS* generadas en el laboratorio.

6.7. OBJETIVO 7. Obtener material necesario para posteriores evaluaciones de interacciones genéticas entre mutantes afectadas en la ruta de JA y mutantes de *BOL*

Además de los experimentos indicados anteriormente, en los que se pudieron obtener resultados que apoyan la hipótesis de este trabajo, se propuso realizar evaluaciones de las interacciones genéticas entre el factor de transcripción *BOL* y los genes de la ruta de los jasmonatos. En este objetivo avanzó con la preparación de material para realizar cruza entre mutantes afectadas en la ruta de JA y mutantes de *BOL*.

6.7.1. Genotipificación de mutante *jaz8*

Siendo *JAZ8* uno de los genes claramente expresados al inducir la actividad del gen *BOL*, era relevante probar las interacciones genéticas entre estos dos genes. La línea de la mutante *jaz8* con la que se cuenta en el laboratorio se había genotipificado para confirmar que se habían obtenido plantas homocigotas para la mutación (una inserción). Sin embargo, no se había comprobado que la mutación ocasionara la pérdida de función del gen y que no se produjera transcrito del mismo, por lo que se procedió a analizar la expresión del gen.

Se pudo comprobar que las 5 plantas homocigotas que se analizaron no producían el transcrito del gen *JAZ8* (Figura 27); por lo tanto, eran mutantes nulas y pudieron ser utilizadas para experimentos siguientes.

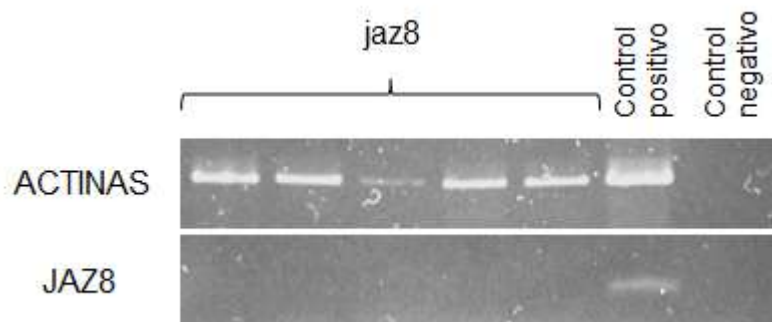


Figura 27. RT-PCR para *JAZ8* en mutante *jaz8*. Como control positivo se usó cDNA de una planta silvestre y como control negativo no se agregó cDNA.

6.7.2. Cruzas con plantas mutantes de genes de la ruta de los jasmonatos

En este objetivo se comenzó con las cruzas marcadas en la Tabla 7.

Tabla 7. Cruzas de plantas mutantes de *BOL* con mutantes de genes de la ruta de jasmonatos. Las X indican las cruzas que se comenzaron a realizar.

	35S-ESR2-ER	<i>drnl-2</i>
<i>aos</i>	X	
<i>myc2</i>	X	X
<i>jaz8</i>	X	
<i>coi1</i>		X
<i>opr3</i>		
<i>jar1</i>		X

Para las cruzas en las que se avanzó, todas se encuentran en la F1 y después se continuará con la genotipificación, como se había mencionado para las cruzas con líneas marcadoras de jasmonatos, realizando una PCR para buscar el promotor 35S en las cruzas con la línea inducible, y para identificar las mutaciones. Además, en el caso de que los fenotipos de pérdida de función aún sean visibles en las dobles mutantes o inducible, también se utilizarán para corroborar que contienen la mutación.

7. DISCUSIÓN

Observaciones y datos obtenidos previamente en el Laboratorio de Identidad Celular, así como comparaciones con fenotipos reportados, derivados de alteraciones en el contenido o vía de jasmonatos, sugerían una relación entre BOL y la ruta de jasmonatos.

En este trabajo se buscó obtener más evidencia, así como materiales biológicos que permitan en el futuro obtener más información sobre la naturaleza de esta relación. Por ello, se procedió a realizar experimentos con diferentes perspectivas, por ejemplo, para determinar si el factor de transcripción afecta a la ruta de jasmonatos o si esta hormona afecta la expresión del gen.

7.1. Cambio en la expresión de genes de JA en las mutantes de *BOL*

Inicialmente se buscó comprobar el cambio en la expresión de algunos genes, candidatos a ser regulados por BOL y relacionados con jasmonatos que se identificaron en un experimento de análisis de expresión global. De los cuatro genes elegidos, el gen *JAZ8* mostró un cambio claro al inducir la actividad de BOL. Como se pudo verificar a través de RT-PCR, el nivel de transcrito del gen *JAZ8* aumentó después de 30 minutos y 8 horas de inducción del gen *BOL*. Sin embargo, en la línea *bol-D*, en la cual está *BOL* expresado constitutivamente, no se observó presencia del transcrito del gen *JAZ8*, sugiriendo que a tiempos más largos de sobreexpresión, el gen se reprime. Su disminución de expresión también podría deberse a los cambios en el desarrollo que se observan en la mutante de ganancia de función *bol-D*, que no se presentan en la línea inducible a tiempos cortos después de la inducción.

Ya que claramente la expresión del gen *JAZ8* se vio afectada por la acción del gen *BOL*, a tiempos cortos y en presencia de cicloheximida, *JAZ8* podría ser un blanco directo del factor de transcripción BOL. Sería muy interesante comprobar si el factor de transcripción es capaz de unirse a sus secuencias regulatorias.

JAZ8 es un gen que responde a jasmonatos, y el aumento inicial de expresión del gen, y su posterior disminución, coinciden también con datos de expresión visualizados en el sitio *Arabidopsis* eFP Browser (Winter *et al.*, 2007), en los que se observa que el gen *JAZ8* es un gen de respuesta temprana a jasmonatos, ya que está expresado a 1 hora después de la aplicación de MeJA a plantas silvestres, pero comienza a disminuir su expresión después de 3 horas de la aplicación del tratamiento (Figura 28). Esto sugiere que el gen tiene una función en los primeros momentos tras el sentido de jasmonatos, pero no en pasos posteriores. Posiblemente algo similar sucede con su regulación por BOL, aunque en tiempos un poco más largos.

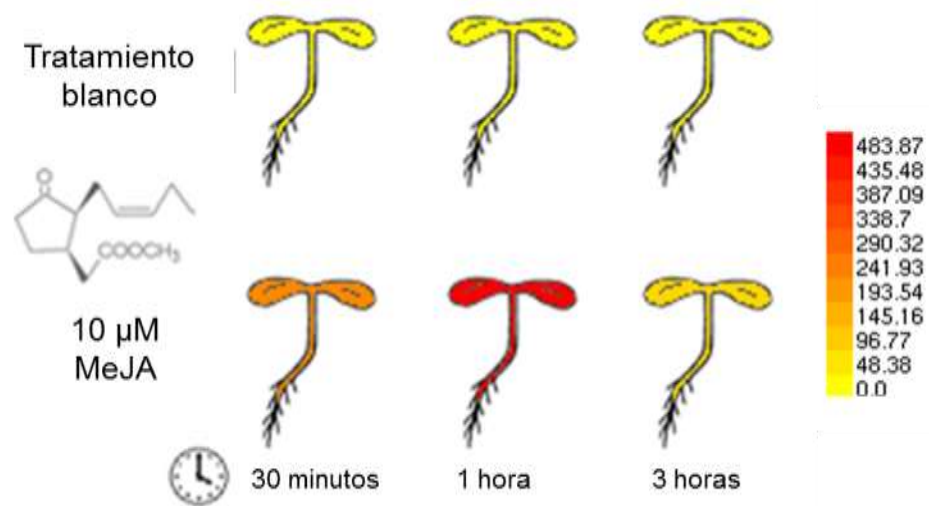


Figura 28. Expresión del gen *JAZ8* en plantas silvestres tratadas con MeJA. Visualizada en eFP browser (Winter *et al.*, 2007).

Más adelante se propone realizar más RT-PCRs probando otros genes que hayan tenido una expresión diferencial significativa en el transcriptoma realizado con la línea *35S-ESR2-ER*. Además, debido a que la expresión del gen *BOL*

normalmente se restringe a etapas tempranas del desarrollo y en tejidos específicos de la planta, puede ser posible que al haber usado plantas de 2 semanas de edad y rosetas completas, el efecto del gen sea enmascarado y tenga que ser necesario usar plantas más jóvenes o tejidos más específicos. Por otro lado, también es importante probar tiempos de inducción del gen un poco más largos (días), ya que en experimentos posteriores se observó un aumento en el nivel de jasmonatos hasta 4 días después de la inducción del gen *BOL*, posiblemente por un efecto mediado por otros genes y no por efecto directo de *BOL*.

7.2. Evaluación fenotípica de plantas *bol-D* y plantas silvestres tratadas con MeJA

Como se había reportado en la publicación de Noir *et al.* (2013), el fenotipo de plantas silvestres tratadas con 50 μ M de MeJA era bastante similar al fenotipo obtenido con la sobreexpresión del gen *BOL* en la mutante *bol-D*, por lo que se planteó el experimento de crecer plantas silvestres y *bol-D* en las mismas condiciones y aplicar el tratamiento con MeJA para comprobar si efectivamente los fenotipos eran similares y hasta qué punto. Además se planteó evaluar estos mismos tratamientos con plantas de pérdida de función del gen *BOL* (*drnl-2*) y la longitud de la raíz para observar de qué manera afectaba el MeJA al desarrollo de las plantas y tener indicaciones sobre si su respuesta a jasmonatos estaba afectada o no.

Una de las observaciones que se pudo realizar fue que a los 9, 13 y 19 ddg las raíces de plantas *bol-D* y de las plantas silvestres tratadas con MeJA tenían una longitud similar. Esto, aunque no descarta que pueda deberse a otras causas, podría sugerir que la reducción en el tamaño de la raíz de la mutante de ganancia de función podría deberse a un exceso de ya sea contenido o sensibilidad o respuesta a jasmonatos. Apoyando esta posibilidad, la mutante de ganancia de función parecía ser más responsiva al tratamiento de MeJA que las plantas silvestres a los 19 días (considerando que el porcentaje de reducción de la longitud

de la raíz fue mayor en las mutantes de ganancia de función que en las silvestres a este tiempo).

Por otro lado, la longitud de las raíces de la mutante de pérdida de función, originalmente más largas que las silvestres, recuperaron una longitud cercana a la normal al ser tratadas con jasmonatos, sugiriendo que los jasmonatos en cierta manera estarían “complementando” el fenotipo mutante. Además, se observó que las raíces de la mutante *dmi-2* eran menos responsivas al tratamiento con MeJA que las plantas silvestres. Esto sugiere que la mutante de pérdida de función tiene una menor sensibilidad (o contenido, o respuesta) a dichas hormonas.

De acuerdo al trabajo de Noir *et al.* (2013), el fenotipo que debía observarse al aplicar MeJA a plantas silvestres era, además de una reducción en el tamaño de la roseta, una curvatura de las hojas, similar a lo observado en la mutante *bol-D*. Lo que se obtuvo en este trabajo, fue solamente una reducción del tamaño de las rosetas, y no la curvatura de las hojas, probablemente debido al uso de la línea Col *gl1* como planta silvestre en la publicación de Noir *et al.* (2013). Sin embargo, la reducción en el tamaño fue muy evidente, sugiriendo nuevamente que al menos este fenotipo podría estar siendo provocado por un incremento o alteración en algún paso de la ruta de los jasmonatos.

Por otro lado, posiblemente, otros fenotipos de *bol-D*, tales como la forma de las hojas, son independientes de la ruta de jasmonatos. Debido a que el gen *BOL* codifica a un factor de transcripción, es muy probable que éste tenga numerosos blancos y esté afectando a varias rutas hormonales al mismo tiempo, no solo a la de los jasmonatos, y el fenotipo de la planta *bol-D* sea ocasionado por la alteración combinada de distintas rutas.

7.3. Comparación de los fenotipos de órganos florales entre plantas *drnl-2* y plantas mutantes de la ruta de los jasmonatos

En publicaciones como la de Qi *et al.* (2015), se muestran imágenes presentando el fenotipo de flores de algunas plantas mutantes de genes de la vía de los jasmonatos, las cuales presentan infertilidad masculina. Estos defectos en el desarrollo floral son similares a los presentados en la mutante *drnl-2*. Este experimento fue planteado para comprobar estas similitudes entre las plantas mutantes de *BOL* y de la ruta de jasmonatos, crecidas en las mismas condiciones.

Se pudo observar que la mutante *coi1*, la cual es insensible a jasmonatos por la falta del receptor COI1, presentó anteras más cortas y menos pétalos que las plantas silvestres, además de tener infertilidad masculina. La mutante de pérdida de función de *BOL* también mostró anteras cortas e infertilidad masculina, lo que sugiere que la pérdida de función de *BOL* y la insensibilidad de las plantas a jasmonatos causan defectos similares en órganos reproductivos.

7.4. Efecto de la aplicación exógena de JA en el fenotipo de la mutante de pérdida de función de *BOL*

Debido a que se habían observado las similitudes de los defectos en órganos reproductivos causados por la insensibilidad a JA y la pérdida de función de *BOL* y que en experimentos realizados previamente en el Laboratorio de Identidad Celular se observó una acumulación de JA en plantas sobreexpresantes de *BOL* (Durán-Medina, 2013), se planteó que probablemente el fenotipo alterado de las plantas de pérdida de función de *BOL* se debiera a una insuficiencia de JA; por lo tanto, se aplicó MeJA exógeno a plantas *drnl-2* para ver si se podía recuperar el fenotipo alterado en las inflorescencias.

Se realizaron aplicaciones de MeJA a inflorescencias de plantas *drnl-2* de 4 semanas de edad con tratamientos de 50 y 500 μM de MeJA por 2 y 8 días de aplicación. Durante y después de los tratamientos se recolectaron las flores que se

fueran abriendo por 7 días consecutivos y se contó el número de pétalos, estambres y filamentos.

Los resultados demostraron que la aplicación exógena de MeJA recuperó parcialmente el fenotipo de la mutante de pérdida de función de *BOL*, aumentando el número de estambres y filamentos. Esto indica que posiblemente una parte del fenotipo observado en la mutante de pérdida de función se debe a una disminución del contenido, sensibilidad o respuesta a jasmonatos.

Una de las razones posibles por las que se pudo lograr solamente la recuperación parcial del fenotipo y no una recuperación completa es que, como ya se había mencionado, *BOL* es un factor de transcripción con múltiples blancos, lo que nos indica que puede estar alterando distintas rutas hormonales al mismo tiempo, no solo la de los jasmonatos. Como es bien conocido, en el desarrollo floral se involucran no solo a los jasmonatos sino a auxinas y giberelinas (Reeves *et al.*, 2012). Otra posibilidad es que además del contenido de jasmonatos, la mutación de pérdida de función afecte también la respuesta a esta fitohormona, de modo que a pesar de aumentarse el contenido, la mutante se vuelve incapaz de responder igual que una planta silvestre.

El hecho de que se haya observado la recuperación parcial del fenotipo en estambres y filamentos solamente en los días intermedios de aplicación del tratamiento puede deberse a que el JA solamente ejerza su función en ciertas etapas del desarrollo floral. De este modo, el no mostrar recuperación en los primeros días después de la aplicación se debería a que las primeras flores colectadas se encontraban en una etapa de desarrollo floral bastante avanzada durante el tratamiento, donde las alteraciones tan drásticas del fenotipo posiblemente ya no podían ser recuperadas por la hormona. Por otro lado, las diferentes concentraciones de jasmonatos contribuyeron en algunos casos de manera distinta a la recuperación de diferentes órganos, sugiriendo que no únicamente la etapa, sino también el control del nivel de jasmonatos es importante para el desarrollo correcto de órganos. *BOL* podría estar involucrado en este tipo de control.

7.5. Nivel de jasmonatos en plantas donde se induce la actividad de *BOL*

Como ya se había mencionado anteriormente, las plantas *bol-D* compartían similitudes con el fenotipo observado en plantas silvestres tratadas con MeJA, y la mutante *drnl-2* compartía características con plantas con niveles reducidos en jasmonatos y se pudo recuperar parcialmente el fenotipo de la mutante de pérdida de función de *BOL* al aplicar MeJA exógeno.

Además, experimentos realizados anteriormente en el Laboratorio de Identidad Celular (Durán-Medina, 2013) mostraron que la mutante de ganancia de función de *BOL* y plantas sobreexpresantes contenían un nivel más alto de jasmonatos que las plantas silvestres. No obstante, el incremento en el nivel de jasmonatos podría deberse a una acumulación debida al estrés ante la alteración del desarrollo ocasionado por la sobreexpresión de *BOL*.

Para conocer si la acumulación de jasmonatos en las plantas se debía a la actividad del gen y no ocasionada por el estrés del desarrollo alterado se decidió utilizar la línea *35S-ESR2-ER* en la que se puede inducir la actividad de *BOL* en cualquier etapa del desarrollo de la planta. En este experimento se cuantificó el ácido jasmónico de plantas *35S-ESR2-ER* inducidas y sin inducir a 48 y 96 horas después de la aplicación del inductor (β -estradiol) y sin inductor.

Los resultados demuestran que a los 2 días de inducción no hubo un cambio en el nivel de JA, pero a los 4 días después de la inducción se observó que el nivel de JA aumentó considerablemente. A este tiempo, los efectos que la sobreexpresión del gen ocasionó en el desarrollo aún no eran tan evidentes, lo que sugiere que la actividad de *BOL* tiene un efecto sobre la acumulación de jasmonatos en las plantas, y el aumento de JA en las plantas de ganancia y sobreexpresión de *BOL* es debida al gen y no al estrés ocasionado por el desarrollo alterado. Este incremento en la acumulación se podría deber posiblemente a un aumento de actividad biosintética, pero no es posible descartar tampoco un decremento de su degradación. Futuros experimentos permitirán obtener información más detallada de este fenómeno. Por ejemplo, sería importante cuantificar los jasmonatos en tiempos intermedios y más

largos para observar cuándo comienza la acumulación de JA y cómo es la acumulación a través del tiempo. Además, la corroboración de los cambios en la expresión de otros genes relacionados a jasmonatos observados en los transcriptomas proporcionará mayor información.

7.6. Respuesta del gen *BOL* a perturbaciones en la ruta de JA

Para conocer si no solamente la función de *BOL* afectaba a la ruta de los jasmonatos, sino que la fitohormona pudiera afectar la expresión del gen, se utilizó la línea marcadora *pBOL-GUS* para evaluar la expresión de *BOL* en ausencia de la hormona.

Para este experimento se evaluó la expresión de *BOL* en plantas marcadoras de 6 ddg, las cuales fueron cultivadas en medio de cultivo con 250 o 500 μM de MeJA por 24, 48 y 72 horas.

El dominio de expresión de *BOL* normalmente se observó en la zona de diferenciación de los primordios foliares y la región apical de algunas raíces laterales. Sin embargo, después de la exposición a DIECA (inhibidor de la síntesis de JA), el dominio de expresión se expandió a las puntas de las raíces con 250 μM de MeJA, y con 500 μM de MeJA. Con la concentración más alta se expandió, pero su expresión fue menos intensa que con 250 μM de MeJA en los tres tiempos de exposición a DIECA, haciéndose más evidente a más horas de exposición. Además, se observó una expresión ectópica de *BOL* en células de la epidermis de la zona diferenciada de la raíz principal, también en los tres tiempos de exposición a DIECA. Como habíamos observado en experimentos anteriores, parece evidente que la acción del gen *BOL* tiene un efecto sobre el nivel de JA en las plantas. Los resultados de estos experimentos sugieren que los jasmonatos también regulan, o al menos afectan la expresión del gen. Será interesante determinar si esta regulación es directamente ejercida por factores de transcripción río abajo de la ruta (como MYC2), o indirectamente afectando otros factores. Dentro de la posibilidad de que sea una consecuencia directa de la reducción del contenido de jasmonatos

dentro de la planta, también podría tratarse de un lazo de retroalimentación, en el que para restaurar el nivel normal de jasmonatos, se promueve la expresión del gen *BOL*, lo que a su vez incrementaría nuevamente el nivel de jasmonatos. Sin embargo, más experimentos son necesarios para corroborar estas especulaciones.

7.7. Cambio en la expresión de líneas marcadoras de JA al inducir, aumentar o reducir la expresión del gen *BOL*

Posteriormente a que se observara la acumulación de JA al inducir la actividad de *BOL*, se decidió evaluar el cambio en la expresión de líneas marcadoras de JA al inducir, aumentar o reducir la expresión del gen *BOL* por medio de cruces de mutantes de genes de JA con líneas mutantes del gen *BOL*, y la expresión transitoria de *BOL* en una línea marcadora de jasmonatos en jitomate.

7.7.1. Expresión transitoria de *BOL* en línea marcadora de jasmonatos en jitomate

Para este experimento se utilizó la línea marcadora de jasmonatos en jitomate *JERE-GUS*, y se realizó una expresión transitoria de *BOL*, para observar la respuesta de la línea después de tres días. Los resultados mostraron que al infiltrar la bacteria que contenía el vector con la construcción *pBOL-BOL-GFP* la expresión de la línea *JERE-GUS* disminuía en comparación con los controles con la bacteria con el vector vacío y el medio de infiltración sin bacteria.

Esto indica que al menos a los tres días de expresión de *BOL* la respuesta a jasmonatos disminuye. No podemos saber todavía si al inicio hay una disminución de la respuesta, y después un aumento, como lo sugeriría el aumento en el contenido de jasmonatos a los cuatro días de la inducción del factor de transcripción. Podríamos repetir este experimento y seguir la expresión cuatro y cinco días después de la infiltración. Sin embargo, al expresar transitoriamente a *BOL* se puede evaluar la respuesta de la línea marcadora por no más de 3-5 días. En

cambio, las cruces de mutantes y línea inducible de *BOL* con las líneas marcadoras de jasmonatos podrán ser evaluadas en tiempos más largos y complementar estos resultados.

7.8 Relación de *BOL* con la ruta de jasmonatos

En resumen, pudimos comprobar, mediante mediciones del contenido de jasmonatos, que la inducción de *BOL* fue capaz de incrementar la acumulación de estas fitohormonas. Además, la comparación de fenotipos tanto de plantas mutantes y silvestres tratadas con jasmonatos, como de plantas afectadas en la ruta de esta fitohormona, sugieren nuevamente que los fenotipos de ganancia y pérdida de función de *BOL* se pueden asociar al aumento o disminución de contenido o sensibilidad a jasmonatos. Se confirmó que el gen *JAZ8*, de respuesta a jasmonatos, se activó a tiempos tempranos de inducción de *BOL* y con el inhibidor de traducción cicloheximida, sugiriendo que puede ser un blanco directo de este factor de transcripción. Se ha descrito que los genes *JAZ* tienen un efecto negativo en la señalización de los jasmonatos, y el aumento de su expresión concuerda bien con los resultados del experimento de expresión transitoria en hojas de jitomate, donde se vio una disminución en la respuesta a jasmonatos. Sin embargo, parece contradictorio con los resultados de contenido de jasmonatos y fenotipos de mutantes de ganancia y pérdida de función de *BOL*. Una posible explicación, apoyada también por los resultados, es que los efectos tempranos y tardíos del gen sobre la ruta sean distintos. Parecería que a tiempos cortos, *BOL* promueve una disminución de la respuesta a jasmonatos (como se observó con la inducción temprana del gen *JAZ8* y la disminución de la respuesta en jitomate 3 días después de la agroinfiltración con *BOL*). En cambio, a tiempos largos, *BOL* parece promover la acumulación de jasmonatos (como se observó en los estudios de acumulación de jasmonatos, a partir de los 4 días, y en los fenotipos de pérdida y ganancia de función). Considerando los tejidos y tiempos en los que se expresó *BOL*, esta posible regulación bifásica en el tiempo tiene sentido, ya que se expresó en las etapas tempranas del desarrollo de órganos, durante las cuales las tasas de

proliferación, expansión y diferenciación celular van cambiando. Los jasmonatos afectan procesos de proliferación y expansión celular, y podrían jugar un papel en la sincronización del desarrollo de las células de un nuevo órgano en ciertas etapas. Más experimentos permitirán comprobar esto y aclarar la relevancia de los jasmonatos en la función biológica del factor de transcripción BOL.

8. CONCLUSIONES

- El gen *JAZ8* está sobreexpresado a 30 min y 8 horas de inducción de *BOL*, pero reprimido cuando *BOL* está sobreexpresado por tiempos más largos.
- La similitud en longitud de las raíces de plantas silvestres tratadas con MeJA y de *bol-D*, podría sugerir que el fenotipo de raíces cortas de esta última podría deberse a un incremento en el contenido, sensibilidad o respuesta a dicha hormona.
- La mutante *bol-D* es más responsiva a jasmonatos que la planta silvestre en los tratamientos de 19 días, al contrario de la mutante *drnl-2* que es menos responsiva, lo que sugiere que el contenido, sensibilidad (percepción o señalización) o la respuesta a jasmonatos podría estar afectada en la mutante de pérdida de función.
- A pesar de la reducción del tamaño de las rosetas de plantas silvestres al aplicar MeJA, no se pudo observar el fenotipo característico de las plantas *bol-D*, que es la curvatura de las hojas, sino que simplemente las plantas redujeron su tamaño, indicando que otros aspectos del fenotipo se deben probablemente a alteraciones en otros procesos.
- La similitud de los defectos observados en órganos reproductivos en la mutante de pérdida de función de *BOL* y plantas con sensibilidad reducida a JA sugieren que la pérdida de función del gen afecta la ruta de jasmonatos, o que el gen actúa como un efector de la ruta de jasmonatos.
- Al aplicar MeJA a inflorescencias de plantas *drnl-2*, el tratamiento de 2 días de aplicación recuperó parcialmente el número de estambres de acuerdo a la concentración de MeJA aplicada, observándose una mayor recuperación del número de estambres con la concentración de 50 μ M de MeJA.

- En el caso de los tratamientos con MeJA por 8 días, el número de filamentos de la mutante aumentó, observándose una mayor recuperación con el tratamiento de 500 μM de MeJA, mientras que en el caso de los estambres la mayor recuperación se observó con el tratamiento de 50 μM de MeJA.
- Para el número de filamentos se observó una clara recuperación parcial del fenotipo el día 4 después del tratamiento en el que solamente se aplicó MeJA por 2 días, además se observó mejor la recuperación con el tratamiento de 50 μM de MeJA. Por otro lado, en el tratamiento donde se aplicó MeJA por 8 días se vio una mejor recuperación con el tratamiento de 500 μM .
- El número de estambres también se vio recuperado parcialmente en ambos tiempos de aplicación de MeJA, aunque en el tratamiento de 2 días de aplicación la recuperación fue mejor a partir del día 3 del tratamiento, y en el tratamiento de 8 días de aplicación la recuperación se observó el día 5 y 6 del tratamiento.
- Después de 4 días de inducir la actividad del gen *BOL* se pudo ver un claro aumento en la acumulación de ácido jasmónico, sugiriendo que el factor de transcripción *BOL* promueve su acumulación.
- El dominio de expresión de *BOL* se expandió a las raíces de plantas marcadoras de *BOL* al inhibir la síntesis de jasmonatos y se observó una expresión ectópica de *BOL* en células de la epidermis de la raíz principal, sugiriendo que los jasmonatos reprimen la expresión de *BOL* en la raíz de *Arabidopsis*.
- La expresión de *BOL* pareció disminuir la respuesta de jasmonatos en la línea marcadora *JERE-GUS* en jitomate a 3 días de expresión del gen.
- Los resultados demostraron que al menos una parte de las funciones de *BOL* está relacionada con la ruta de jasmonatos. *BOL* parece afectar tanto la señalización de jasmonatos como el contenido de estas fitohormonas,

posiblemente a tiempos distintos. Por otro lado, estas fitohormonas también parecen jugar un papel en la regulación del gen *BOL*. Se requieren más experimentos en el futuro que permitan aclarar la naturaleza de esta relación y obtener más evidencia sobre su relevancia biológica, particularmente la asociada a la formación de nuevos órganos.

9. REFERENCIAS

- Acosta I., Laparra H., Romero S., Schmelz, E., Hamberg, M., Mottinger, J., Moreno, M., Dellaporta, S. (2009). *tasselseed1 is a lipoxygenase affecting jasmonic acid signaling in sex determination of maize*. Science 323 (5911): 262-265.
- Acosta, I., Gasperini, D., Chételat, A., Stoltz, S., Santuari, L., Farmer, E. (2013). *Role of NINJA in root jasmonate signaling*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110 (38): 15473-15478.
- Balbi, V., Devoto, A. (2008). *Jasmonate signalling network in Arabidopsis thaliana: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios*. New Phytologist 177: 301-318.
- Bari, R. y Jones, J. (2009). *Role of plant hormones in plant defense responses*. Plant Molecular Biology 69: 473-488.
- Bell, E., Creelman, R., Mullet, J. (1995). *A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92: 8675-8679.
- Birnboim, H. y Doly, J. (1979). *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Research 7 (6): 1513-1523.
- Brown, R., Kazan, K., McGrath, K., Maclean, D., Manners, J. (2003) *A role for the GCC-Box in jasmonate-mediated activation of the PDF1.2 gene of Arabidopsis*. Plant Physiology 132: 1020-1032.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J., Lorenzo, O., García-Casado, G., López-Vidriero, I., Lozano, F., Ponce, M., Micol, J.,

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

- Chini, A., Monte, I., Zamarreño, A., Hamberg, M., Lassueur, S., Reymond, P., Weiss, S., Stintzi, A., Schaller, A., Porzel, A., García-Mina, J., Solano, R. (2018). *An OPR3-independent pathway uses 4,5-didehydrojasmonate for jasmonate synthesis*. Nature Chemical Biology 14: 171-180.
- Clough, S., Bent, A. (1998). *Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal 16 (6): 735-743.
- Creelman, R., Mullet, J. (1997). *Biosynthesis and action of jasmonate in plants*. Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48: 355-381.
- Durán-Medina, Y. (2013). *Determinación de la interacción del gen BOL con jasmonatos y citocininas en relación al desarrollo de órganos*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato.
- Eklund, D. M., Cierlik, I., Ståldal, V., Claes, A., Vestman, D., Chandler, J., Sundberg, E. (2011). *Expression of Arabidopsis SHORT INTERNODES/STYLISH family genes in auxin biosynthesis zones of aerial organs is dependent on a GCC Box-Like regulatory element*. Plant Physiology 157: 2069-2080.
- Eng, F. (2008). *Jasmonatos: compuestos de alto valor para la agricultura. Parte I. Actividad biológica y ruta biosintética del ácido jasmónico en plantas*. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar 42 (1-3): 51-59.
- Farmer, E., Caldelari, D., Pearce, G., Walker-Simmons, M. K., Ryan, C. (1994). *Diethyldithiocarbamic acid inhibits the octadecanoid signaling*

pathway for the wound induction of proteinase inhibitors in tomato leaves. Plant Physiology 106: 337-342.

- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., Miersch, O., Wasternack, C., Solano, R. (2009). *(+)-7-iso-Jasmonoyl-L- isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate.* Nature Chemical Biology 5 (5): 344-350.
- Gfeller, A., Dubugnon, L., Liechti, R., Farmer, E. (2010). *Jasmonate biochemical pathway.* Science Signalling 3: 109.
- Glauser, G., Grata, E., Dubugnon, L., Rudaz, S., Farmer, E., Wolfender, J. (2008). *Spatial and temporal dynamics of jasmonate synthesis and accumulation in Arabidopsis in response to wounding.* The Journal Of Biological Chemistry 283 (24): 16400-16407.
- Hamberg, M., Falhstadius, P. (1990). *Allene oxide cyclase: a new enzyme in plant lipid metabolism.* Archives of Biochemistry and Biophysics 276 (2): 518-526.
- Harrison, S., Mott, E., Parsley, K., Aspinall, S., Gray, J., Cottage, A. (2006). *A rapid and robust method of identifying transformed Arabidopsis thaliana seedlings following floral dip transformation.* Plant Methods 2(19): 1-7.
- Howe, G. (2018). *Metabolic end run to jasmonate.* Nature Chemical Biology 14: 109-110.
- Ikeda, Y., Banno, H., Niu, Q. W., Howell, S. H., Chua, N. H. (2006). *The ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 2 gene in Arabidopsis regulates CUP-SHAPED COTYLEDON 1 at the transcriptional level and controls cotyledon development.* Plant Cell Physiology 47 (11): 1443-1456.

- Ito, T., Ng, K-H., Lim, T-S., Yu, H., Meyerowitz, E. (2007). *The homeotic protein AGAMOUS controls late stamen development by regulating a jasmonate biosynthetic gene in Arabidopsis*. *The Plant Cell* 19: 3516-3529.
- Jefferson, R., Kavanagh, T., Bevan. M. (1987). *GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants*. *The EMBO Journal* 6 (13): 3901-3907.
- Kirch, T., Simon, R., Grünewald, M, Werr, W. (2003). *The DORNROSCHEN/ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1 gene of Arabidopsis acts in the control of meristem cell fate and lateral organ development*. *The Plant Cell* 15: 694-705.
- Kombrink, E. (2012). *Chemical and genetic exploration of jasmonate biosynthesis and signaling paths*. *Planta* 236: 1351-1366.
- Koo, A., Howe G. (2009). *The wound hormone jasmonate*. *Phytochemistry* 70: 1571-1580.
- Larrieu, A., Champion, A., Legrand, J., Lavenus, J., Mast, D., Brunoud, G., Oh, J., Guyomarc'h, S., Pizot, M., Farmer, E., Turnbull, C., Vernoux, T., Bennett, M., Laplaze. L. (2015). *A fluorescent hormone biosensor reveals the dynamics of jasmonate signalling in plants*. *Nature Communications*. 6: 6043.
- Latchman, D. (1997) *Transcription factors: An overview*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29 (12): 1305-1312.
- Leon, J. y Sánchez-Serrano, J. *Molecular biology of jasmonic acid biosynthesis in plants*. *Plant Physiology and Biochemistry* 37 (5): 373-380.
- Lorenzo, O. y Solano, R. (2005). *Molecular players regulating the jasmonate signalling network*. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 532-540.

- Marsch-Martínez, N., Greco, R., Van Arkel, G., Herrera-Estrella, L., Pereira, A. (2002). *Activation tagging using the En-1 maize transposon system in Arabidopsis*. Plant Physiology 129: 1544-1556.
- Marsch-Martinez, N., Greco, R., Becker, J.D., Dixit, S., Bergervoet, J.H., Karaba, A., de Folter, S., Pereira, A. (2006). *BOLITA, an Arabidopsis AP2/ERF-like transcription factor that affects cell expansion and proliferation/differentiation pathways*. Plant Molecular Biology 62: 825-843.
- Mueller, M. (1997). *Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis*. Physiologia Plantarum 100: 653-663.
- Nag, A., Yang, Y., Jack, T. (2007). *DORNROSCHEN-LIKE, an AP2 gene, is necessary for stamen emergence in Arabidopsis*. Plant Molecular Biology 65: 219-232.
- Noir, S., Bömer, M., Takahashi, N., Ishida, T., Tsui, T., Balbi, V., Shanahan, H., Sugimoto, K., Devoto, A. (2013). *Jasmonate controls leaf growth by repressing cell proliferation and the onset of endoduplication while maintaining a potential stand-by mode*. Plant Physiology 161: 1930-1951.
- Park, J., Halitschke, R., Kim, H., Baldwin, I., Feldmann, K., 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*. The Plant Journal 31: 1-12.
- Parthier B. (1991). *Jasmonates, New regulators of plant growth and development: Many facts and few hypotheses on their actions*. Botanica Acta 104:446-454.
- Piotrowska, A., Bajguz, A. (2011). *Conjugates of abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, and jasmonates*. Phytochemistry 72: 2097-2112.

- Qi, T., Huang, H., Song, S., Xie, D. (2015). *Regulation of jasmonate-mediated stamen development and seed production by a bHLH-MYB complex in Arabidopsis*. *The Plant Cell* 27: 1620:1633.
- Reeves, P., Ellis, C., Ploense, S., Wu, M., Yadav, V., Tholl, D., Chételat, A., Haupt, I., Kennerley, B., Hodgens, C., Farmer, E., Nagpal, P., Reed, J. (2012). *A regulatory network for coordinated flower maturation*. *PLoS Genetics* 8 (2): 1-17.
- Reymond, P., Bodenhausen, N., Van Poecke, R., Krishnamurthy, V., Dicke, M., Farmer, E. (2004). *A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore*. *The Plant Cell* 16: 3132-3147.
- Rushton, P. J., Reinstädler, A., Lipka, V., Lippok, B., Somssich, I. E. (2002) *Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound- induced signaling*. *Plant Cell* 14:749-762.
- Schaller, F., Biesgen, C., Müssig, C., Altmann, T., Weiler, E. W. 2000. *12-Oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis*. *Planta* 210: 979–984.
- Schommer, C., Palatnik, J., Aggarwal, P., Chételat, A., Cubas, P., Farmer, E., Nath, U., Weigel, D. (2008). *Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets*. *Plos Biology* 6 (9): 1991-2001.
- Staswick, P., Su, W., Howell, S. (1992). *Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an Arabidopsis thaliana mutant*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 6837-6840.
- Song, S., Qi, T., Huang, H., Ren, Q., Wu, D., Chang, C., Peng, W., Liu, Y., Peng, J., Xie, D. (2011). *The jasmonate-ZIM domain proteins interact with the*

R2R3-MYB transcription factors MYB21 and MYB24 to affect jasmonate-regulated stamen development in arabidopsis. The Plant Cell 23: 1000-1013.

- Tjian, R., Maniatis, T. (1994). *Transcriptional activation: a complex puzzle with a few easy pieces.* Cell 77: 5-8.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., Yang He, S., Howe, G., Browse, J. (2007) *JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{COI1} complex during jasmonate signalling.* Nature 448:661-665.
- Truman, W., Bennett, M., Kubigsteltig, I., Turnbull, C., Grant, M. (2007). *Arabidopsis systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104 (3): 1075-1080.
- Van der Does, D., Leon-Reyes, A., Koornneef, A., Van Verk, M., Rodenburg, N., Pauwels, L., Goosens, A., Körbes, A., Memelink, J., Ritsema, T., Van Wees, S., Pieterse, C. (2013). *Salicylic acid suppresses jasmonic acid signaling downstream of SCFCOI1-JAZ by targeting GCC promoter motifs via transcription factor ORA59.* The Plant Cell 29 (5): 1-18.
- Wasternack, C. (2007). *Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development.* Annals of Botany 100: 681-697.
- Wasternack, C., Hause, B. (2013). *Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in Annals of Botany.* Annals of Botany 111: 1021– 1058.
- Wasternack, C. y Hause, B. (2018). *A bypass in jasmonate biosynthesis – the OPR3-independent formation.* Trends in Plant Science 4: 276-279.

- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G., Provart, N. (2007). *An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets*. PLoS One 2 (8): 1-12.
- Xu, B. y Timko, M. (2004). *Methyl jasmonate induced expression of the tobacco putrescine N-methyltransferase genes requires both G-box and GCC-motif elements*. Plant Molecular Biology 55: 743-761.
- Yan, Y., Christensen, S., Isakeit, T., Engelberth, J., Meeley, R., Hayward, A., Neil Emery, R., Kolomietz, M. (2012). *Disruption of OPR7 and OPR8 reveals the versatile functions of jasmonic acid in maize development and defense*. The Plant Cell 24: 1420-1436.
- Yan, Y., Borrego, E., Kolomietz, M. (2013). *Jasmonate biosynthesis, perception and function in plant development and stress responses*. Prof. Rodrigo Valenzuela Baez (Ed.) In Tech 16: 393-442.
- Yuan Z., Zhang D. (2015). *Roles of jasmonate signalling in plant inflorescence and flower development*. Current Opinion in Plant Biology 27: 44-51.
- Zarei, A., Körbes, A., Younessi, P., Montiel, G., Champion, A., Memelink, J. (2011). *Two GCC boxes and AP2/ERF-domain transcription factor ORA59 in jasmonate-ethylene mediated activation of the PDF1.2 promoter in Arabidopsis*. Plant Molecular Biology 75: 321-331.
- Zhang Y., Turner J. (2008) *Wound-induced endogenous jasmonates stunt plant growth by inhibiting mitosis*. PLoS ONE 3(11): 1-9.