



U. M. S. N. H.

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS
MAESTRIA EN CIENCIAS EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL.**

Título:

**“CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS
MORFOGENÉTICOS Y MOLECULARES DE LAS
ALCAMIDAS Y N-ACILETANOLAMIDAS EN
ARABIDOPSIS THALIANA”**

PRESENTA:

Q.F.B. MAYRA MILLÁN GODÍNEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias en Biología Experimental

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. José López Bucio

Morelia, Michoacán, Diciembre 2007

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE
BIOLOGÍA DEL DESARROLLO VEGETAL DEL INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS DE LA
UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO
BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. JOSÉ LÓPEZ BUCIO.

A mis hijos:

Diego y Miguel, ustedes son mi inspiración y
mi razón de ser.

AGRADECIMIENTOS.

 Al **Instituto de Investigaciones Químico Biológicas**, por abrirme las puertas a la educación.

 Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por la beca otorgada para la realización de este postgrado.

 Al **D.C. José López Bucio**, por su guía durante la realización de este trabajo, por su apoyo, comprensión, paciencia, dedicación, por compartir todo su saber conmigo y simplemente por estar ahí siempre que necesite de su ayuda.

 A la **D.C. Eva Luz Soriano**, al **D.C. Rafael Salgado** y al **D. C. Ernesto García**, por el tiempo invertido en la revisión de esta tesis, por sus opiniones, críticas y consejos que ayudaron a enriquecer y mejorar este trabajo.

 A todos los **profesores del IIBQ**, por compartir conmigo sus conocimientos durante este tiempo.

 A mis **compañeros de la generación 2005 – 2007**, por compartir este tiempo, porque todos tocaron mi vida, nunca los olvidare.

 A **Arianna, Alina, Randy, Poncho, Javier y Exon**, compañeros y buenos amigos del laboratorio. Gracias por su apoyo, por aguantarme, por ayudarme siempre.

 A **Ramón Pelagio**, muchas gracias, porque en varias ocasiones, los experimentos no hubieran sido posible sin ti.

 A la **Sra. Rosy** por siempre estar dispuesta cuando necesité algo.

 A la **QFB. Maria Guadalupe Pérez Chávez** y el **Prof. Carlos A. Armenta**, por el apoyo brindado en todos los aspectos y por el impulso dado para realizar este postgrado.

 A **mis padres, Martha y Aurelio**, que aunque ya no están conmigo me dieron todo para ser la persona que soy hoy.

 A mis hermanos, especialmente a **Patricia** por la ayuda al cuidar a los niños todas las veces que lo necesite.

 A **Diego y Miguel**, gracias niños por existir, por darme un aliciente para seguir adelante y además por hacerlo todo más difícil.

 Y sobre todo, por todo lo que me ha dado, por compartir conmigo su vida, ser mi hombro para apoyarme, por aguantar mi genio y mis histerias, por ayudarme siempre y no dejarme nunca sola, a mi esposo, compañero y amigo, **QFB. Ricardo Sandoval Pérez**, todo este esfuerzo también fue por ti.

ÍNDICE

INDICE DE CONTENIDO.	I
INDICE DE FIGURAS.	III
INDICE DE TABLAS.	V
RESUMEN.	VI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1. Las plantas como sistema de estudio.....	2
2.2. El desarrollo de las plantas.....	2
2.3. <i>Arabidopsis thaliana</i>	3
2.4. Reguladores del crecimiento.....	4
2.5. Auxinas.....	5
2.6. Citocininas.....	7
2.7. Interacción entre auxinas y citocininas.....	9
2.8. Nuevas moléculas señal.....	10
2.9. <i>N</i> -aciletanolamidas.....	10
2.10. Alcamidas.....	12
2.11. Efectos de las <i>N</i> -aciletanolamidas y alcamidas sobre <i>A. thaliana</i>	14
3. JUSTIFICACIÓN.....	16
4. HIPÓTESIS.....	16
5. OBJETIVO GENERAL.....	17
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	18
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19

8.1. Material biológico.....	19
8.2. Condiciones de crecimiento.	20
8.3. Análisis histológico de la actividad de β -glucuronidasa.....	22
8.4. Variables de crecimiento.....	22
8.5. Análisis de datos.	23
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	24
9.1. Efecto del ácido indol acético en el desarrollo de la raíz de <i>A. thaliana</i>	24
9.2. Efecto de la kinetina en el crecimiento de la raíz primaria.....	26
9.3. Efecto de la afinina sobre la arquitectura de la raíz de <i>A. thaliana</i>	28
9.4. Efecto de la capriletanolamida sobre la arquitectura de la raíz de <i>A. thaliana</i>	30
9.5. Efecto de la <i>N</i> -isobutil decanamida sobre la arquitectura de la raíz de <i>A. thaliana</i>	32
9.6. Comparación de los efectos de la afinina, capriletanolamida y <i>N</i> -isobutil decanamida sobre la longitud de la raíz primaria de <i>A. thaliana</i>	34
9.7. Comparación de los efectos de las alcamidas con auxinas y citocinininas.	36
9.8. Efectos de la <i>N</i> -isobutil decanamida en el follaje de <i>A. thaliana</i>	37
9.9. Identificación de marcadores moleculares inducibles por la <i>N</i> -isobutil decanamida.....	39
9.10. Efecto de la <i>N</i> -isobutil decanamida en la morfogénesis de mutantes afectadas en componentes de la ruta de señalización de auxinas y citocinininas.....	46
9.12. Modelo para explicar los efectos de la <i>N</i> -isobutil decanamida en el desarrollo vegetal.....	52
10. CONCLUSIONES.....	54
11. LITERATURA CITADA.	55
12. APENDICE.....	63
12.1. Lista de abreviaturas para las mutantes utilizadas en este trabajo.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Estructura química de las auxinas.....	5
Figura 2. Estructura química de las citocininas.....	8
Figura 3. Estructura química de las <i>N</i> -aciletanolamidas.....	11
Figura 4. <i>Heliopsis longipes</i> y la estructura química de las alcamidas.....	13
Figura 5. Efecto del ácido indolacético sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de <i>A. thaliana</i>	24
Figura 6. Efecto de los tratamientos con AIA sobre la arquitectura de la raíz de <i>A. thaliana</i>	25
Figura 7. Efecto de la kinetina sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de <i>A. thaliana</i>	26
Figura 8. Efecto de la kinetina en la arquitectura de la raíz de <i>A. thaliana</i>	27
Figura 9. Efecto de la afinina sobre la arquitectura de la raíz de <i>A. thaliana</i>	29
Figura 10. Efecto de la capriletanolamida sobre la arquitectura de la raíz de <i>A. thaliana</i>	31
Figura 11. Efecto de la <i>N</i> -isobutil decanamida sobre la arquitectura de la raíz de <i>A. thaliana</i>	33
Figura 12. Comparación de las curvas resultantes de los tratamientos con afinina, capriletanolamida y <i>N</i> -isobutil decanamida para la longitud de la raíz primaria.....	34

Figura 13. Efectos de la <i>N</i> -isobutil decanamida sobre el follaje de <i>A. thaliana</i>	38
Figura 14. Expresión basal de ARR5::GUS en <i>Arabidopsis thaliana</i>	41
Figura 15. Expresión de ARR5::GUS con <i>N</i> -isobutil decanamida.....	42
Figura 16. Expresión basal de CycD3::GUS en <i>Arabidopsis thaliana</i>	44
Figura 17. Efecto de la <i>N</i> - isobutil decanamida en la expresión de CycD3::GUS..	45
Figura 18. Efecto de la <i>N</i> -isobutil decanamida en el crecimiento de la raíz primaria de las mutantes afectadas en componentes de la ruta de señalización de auxinas.....	47
Figura 19. Efecto de la <i>N</i> -isobutil decanamida en el crecimiento de la raíz primaria de las mutantes afectadas en componentes de la ruta de señalización de citocininas.....	48
Figura 20. Mutantes hipersensibles al efecto de la <i>N</i> -isobutil decanamida.....	50
Figura 21. Mutante resistente a <i>N</i> -isobutil decanamida.....	50
Figura 22. Efecto de la <i>N</i> -isobutildecanamida en el crecimiento de plantas silvestres (Col-0) y las mutantes M43.....	51
Figura 23. Modelo para explicar la actividad de la <i>N</i> -isobutil decanamida en <i>A.</i> <i>thaliana</i>	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Marcadores moleculares utilizados.....	19
Tabla 2. Mutantes afectadas en la ruta de señalización de auxinas y citocininas	20
Tabla 3. Comparación de la actividad de los compuestos utilizados.....	37
Tabla 4. Expresión de los marcadores moleculares con <i>N</i> -isobutil decanamida.....	40

RESUMEN

Las plantas dependen para su crecimiento y desarrollo de redes de señalización dirigidas por los reguladores del crecimiento entre los que destacan las auxinas y las citocininas, entre otros. Recientemente se describió una nueva clase de moléculas de carácter lipídico que son las alcanidas y las *N*-aciletanolamidas, cuyos efectos en la morfogénesis vegetal han comenzado a estudiarse.

En este trabajo, se analizaron los efectos del ácido indol acético (AIA), de la kinetina y de las alcanidas afinina, capriletanolamida y *N*-isobutil decanamida, en donde encontramos que la *N*-isobutil decanamida fue la más eficaz en inhibir el crecimiento de la raíz primaria además de tener otros efectos en el follaje, como la formación de callos o neoplasias.

Al ser las alcanidas moléculas de reciente descubrimiento, aún no se conoce su mecanismo de acción y bajo esa premisa se evaluaron los efectos de la alcanida más activa identificada, la *N*-isobutil decanamida, sobre la expresión de diversos marcadores moleculares para identificar procesos fisiológicos regulables por esta sustancia. Este compuesto es capaz de elevar la expresión de ARR5::*GUS* y CycD3::*GUS*, ambos genes involucrados en la ruta de señalización de las citocininas.

Para determinar una posible interacción entre las ruta de señalización de las citocininas con la *N*-isobutil decanamida. Se estudiaron los efectos de diferentes concentraciones de *N*-isobutil decanamida en el crecimiento de la raíz primaria de mutantes afectadas en los receptores de citocininas, AHK2, AHK3 y CRE1. Las respuestas de las mutantes fueron similares al de las plantas silvestres de *A. thaliana*. Tomando en cuenta que ninguna de estas mutantes resultó ser resistente al efecto de la *N*-isobutil decanamida en cuanto al crecimiento de la raíz primaria, se descartó la posibilidad de la participación de estos elementos por lo menos en cuanto al marcador del desarrollo analizado.

Por otra parte, se realizó un escrutinio de semilla mutagenizada con etil metano sulfonato para aislar mutantes resistentes o hipersensibles al efecto de la *N*-isobutil decanamida en cuanto al crecimiento de la raíz primaria. Esta estrategia permitió la identificación de una mutante resistente (M4), que manifiesta un crecimiento sostenido de la raíz primaria en condiciones inhibitorias de la alkamida y una mutante hipersensible (M4) que forma callos en todo el follaje.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que las alcanidas y las *N*-aciletanolamidas podrían regular el crecimiento y desarrollo vegetal mediante un mecanismo de señalización común, ya que provocan efectos similares sobre el crecimiento de la raíz primaria, que son diferentes en actividad con el ácido indol acético (una auxina) y la kinetina (una citocinina). Las mutantes sugieren que las respuestas de *A. thaliana* a las alcanidas están controlados genéticamente.

1. INTRODUCCIÓN.

Las plantas producen diversas sustancias que regulan su crecimiento y desarrollo. Estas sustancias son denominadas hormonas vegetales o reguladores del crecimiento (RC) y ejercen sus funciones mediante programas de señalización intracelular específicos que conducen al encendido o apagado de genes (del Pozo *et al.*, 2005). Por sus efectos biológicos y por su distribución amplia en el reino vegetal se consideran 6 clases principales de RC: las auxinas, las citocininas, las giberelinas, el etileno, el ácido abscísico y los brasinoesteroides. Todos estos compuestos son requeridos para la viabilidad celular, participan en procesos específicos de desarrollo y como integradores de señales ambientales (Weyers y Paterson, 2001).

La formación de órganos y tejidos ocurre por interacciones entre RC. Se ha descrito que las auxinas interactúan con las citocininas para regular el crecimiento de la raíz primaria, la formación de pelos radiculares y de las raíces laterales. De hecho, la combinación de diferentes concentraciones de auxinas y de citocininas en el medio de cultivo de explantes posibilita la regeneración de órganos y es la base de los métodos para el cultivo de tejidos “*in vitro*”. También se acepta que los RC modulan la morfogénesis vegetal a través del control del ciclo celular (del Pozo *et al.*, 2005).

Recientemente se ha evidenciado la existencia de un grupo nuevo de RC que incluye moléculas derivadas de la hidrólisis de fosfolípidos que incluye a los esfingolípidos, el ácido fosfatídico y las alcanidas. Estas moléculas son ubicuas en eucariontes, los esfingolípidos y el ácido fosfatídico se han encontrado en animales regulando importantes rutas de señalización y recientemente en plantas donde controlan diferentes aspectos adaptativos tales como la apertura de los estomas y la respuesta a patógenos (Chapman, 2004; Motes *et al.*, 2005). Las alcanidas regulan la arquitectura de la raíz de las plantas a través del control de la división, la elongación y la diferenciación celular (Ramírez-Chávez *et al.*, 2004).

2. ANTECEDENTES.

Las plantas como sistema de estudio.

Las plantas como organismos sésiles pasan su ciclo de vida ancladas a un sustrato. De manera general se pueden dividir en dos sistemas, la parte aérea o follaje y el sistema radicular. El follaje está constituido por el tallo, las ramas y las hojas, que se derivan de la actividad proliferativa del meristemo apical (Norberg *et al.*, 2005). En las hojas ocurre la fotosíntesis, que es la principal fuente de carbohidratos para los tejidos consumidores de la planta incluyendo la raíz, las flores y los frutos. Las raíces tienen como función el anclaje al suelo y la captación de nutrientes y agua. El sistema radicular consta de tres partes principales diferenciadas: la raíz primaria, las raíces laterales y los pelos radiculares. El crecimiento de la raíz ocurre por la producción de nuevas células en el meristemo radicular, que se localiza en la parte más distal de la raíz protegido por la cofia y es la región donde se lleva a cabo la división celular. Después de dividirse, las células pasan a la zona de elongación donde aumentan de tamaño antes de diferenciarse. Las raíces laterales surgen a partir de las células del periciclo, que es un tejido adyacente al sistema vascular, para formar un nuevo meristemo. Su función es aumentar la superficie de absorción de la raíz y la exploración del suelo (Himanen *et al.*, 2002; Oakenful *et al.*, 2003).

El desarrollo de las plantas.

El desarrollo de las plantas difiere del de los animales en tres aspectos principales: i) el desarrollo de los animales produce un embrión que antes del nacimiento ya posee la mayoría de los órganos para el funcionamiento del organismo, mientras que la embriogénesis de una planta se caracteriza por la producción de grupos de células totipotenciales (células madre) que darán lugar a los meristemos apical y distal del embrión. Estos meristemos se conservan durante el desarrollo postembrionario y permiten la formación de órganos y tejidos que constituyen a una planta adulta. De

esta manera, el crecimiento post-embrionario en las plantas no solo involucra el aumento de tamaño del organismo, como ocurre en los animales, sino también la producción de la mayoría de los órganos. ii) el crecimiento post-embrionario en las plantas es continuo e indeterminado, esto es que las células madres continuamente producen nuevos tejidos, en contraste con la restricción de crecimiento que tienen los animales en los que la organogénesis solo ocurre en la embriogénesis. iii) una diferencia igualmente importante entre los ciclos de vida de las plantas y los animales está relacionada con la naturaleza sésil de las plantas y la manera como ajustan su crecimiento y desarrollo en respuesta a los factores ambientales. Los factores como la luz, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes pueden impactar la división, elongación y diferenciación celular y de esta forma regular el crecimiento, actuando como señales que operan mediante rutas de específicas o bien a través de su interacción con reguladores del crecimiento (López-Bucio *et al.*, 2003).

Arabidopsis thaliana.

Arabidopsis thaliana es un excelente modelo para el estudio de los procesos fisiológicos y moleculares, ya que el ser una angiosperma de un tamaño pequeño (30 cm) y un ciclo de vida corto (6-8 semanas), tiene una alta fecundidad y se puede cultivar en un espacio reducido. La raíz de *Arabidopsis* tiene muchas características que la hacen un buen modelo para estudiar procesos de crecimiento y desarrollo. La simplicidad de su organización celular la hace manejable para manipulación experimental y para escrutinios de mutantes a gran escala cubriendo varios aspectos morfogénéticos (Scheres y Wolkenfelt, 1998).

El crecimiento de la raíz primaria, la morfología de los pelos radiculares, la elongación de las células y la actividad del meristemo apical son marcadores biológicos fáciles de analizar para identificar nuevos mecanismos de señalización en plantas o nuevos RC (Scheres y Wolkenfelt, 1998).

Reguladores del crecimiento.

Los reguladores del crecimiento o fitohormonas son compuestos de diferente naturaleza química que pueden alterar el desarrollo vegetal en concentraciones pequeñas. El concepto de hormona tal como fue desarrollado para los animales no es fácil de extrapolar a las plantas. Por un lado las plantas no cuentan con un sistema de transporte tan eficiente como la circulación sanguínea, por otro lado las plantas no tienen el equivalente a un sistema nervioso central como el de los animales para la integración y la coordinación de todas las actividades fisiológicas. Aún así, las plantas tienen un sistema sofisticado para integrar información del ambiente y responder activamente a los estímulos bióticos y abióticos; de igual manera, poseen mecanismos para la comunicación entre los diferentes órganos y tejidos. Actualmente se acepta que los reguladores del crecimiento forman un grupo de moléculas integradoras de información, cuyas vías de señalización interactúan con frecuencia para regular la morfogénesis vegetal. Los reguladores más estudiados son las auxinas, las citocininas, las giberelinas, el ácido abscísico, el ácido jasmónico y el etileno (López-Bucio *et al.*, 2006).

Las hormonas vegetales son generalmente moléculas pequeñas, que ejercen sus efectos biológicos a concentraciones bajas y regulan aspectos celulares diversos. Estos compuestos se pueden transportar entre los diferentes tejidos a través del sistema vascular (xilema y floema), como en el caso de las auxinas o mediante los espacios intercelulares como el etileno (Gray, 2004).

Prácticamente todos los aspectos del crecimiento vegetal están bajo control de los RC, al menos en cierto grado. Un solo regulador puede afectar una amplia gama de aspectos celulares y procesos de desarrollo, mientras que por otro lado, un solo proceso puede ser influenciado, al mismo tiempo, por múltiples hormonas (Gray, 2004).

Auxinas.

Las auxinas son un grupo de RC de gran importancia para el desarrollo de las plantas, ya que modulan muy diversos procesos entre ellos las respuestas trópicas a la luz y la gravedad, la arquitectura general de la raíz y el follaje, la formación de órganos y el desarrollo vascular (Woodward y Bartel, 2005a).

La principal auxina en las plantas es el ácido indol-acético (AIA), aunque existen otros compuestos con actividad de auxina como el ácido acetil indol-aspártico o el ácido 4-cloro indol-acético que también están presentes en las plantas, entre ellos el más estudiado es el ácido indol-acético. La fórmula general de las auxinas muestra que son derivados del triptofano (Figura 1) (Kende y Zeevaart, 1997).

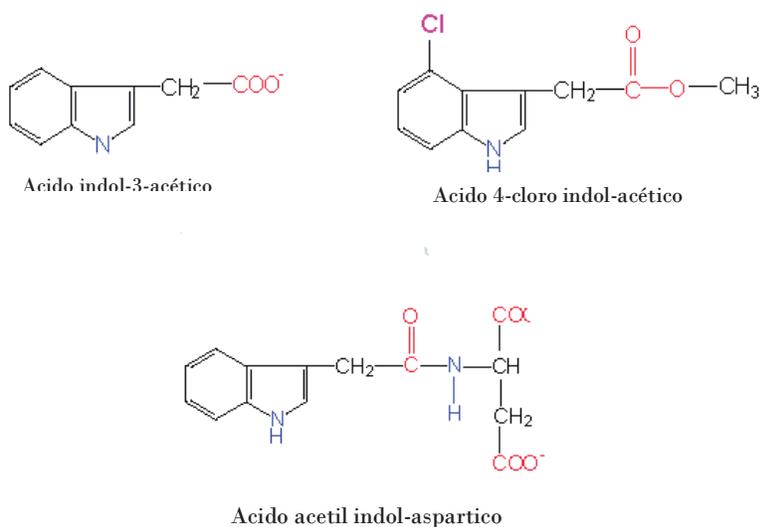


Figura 1. Estructura química de las auxinas.

En *Arabidopsis thaliana* se ha reportado que la síntesis de IAA ocurre en las hojas jóvenes, en los cotiledones y en las raíces, a través de varias rutas dependientes de triptofano y que todas ellas contribuyen a la regulación de la producción de IAA (Ljung *et al.*, 2001; Woodward y Bartel, 2005a).

Las auxinas en concentraciones bajas promueven la elongación de los hipocotilos, así como del follaje y las raíces. Si la concentración se aumenta, los efectos son opuestos y la elongación de las raíces y el tallo es inhibido. Las auxinas también están involucradas en el control de la abscisión, incrementan la tasa de división en el cambium, ayudan al desarrollo del ovario y son responsables de la dominancia apical. Las auxinas incrementan la plasticidad de la pared celular y causan un flujo de protones hacia fuera de la célula, que por sí mismos pueden activar cascadas de señalización (Woodward y Bartel, 2005a).

La gran variedad de procesos vegetales que están influenciados por las auxinas plantea la pregunta de cómo una sola molécula puede afectar tantas respuestas diferentes; la identificación de algunos de los genes que están implicados en la traducción de la señal así como en el transporte polar de las auxinas ha ayudado a contestar, aunque parcialmente esta pregunta. Se sabe que el transporte polar de las auxinas representa un sistema especial de entrega usado por la planta para movilizar el AIA de la fuente de auxinas en el follaje hacia los tejidos de reserva tales como la raíz. En las raíces, el transporte polar de auxinas que moviliza el AIA que viene del follaje hacia el ápice de la raíz (transporte acropétalo) es importante para el desarrollo de las raíces laterales, mientras que un transporte inverso, desde el meristemo radicular hacia la zona de transición entre la raíz y el tallo (transporte basipétalo) regula el gravitropismo (Casimiro *et al.*, 2001).

Se han identificado varias familias de proteínas que participan en la regulación transcripcional tanto positiva como negativa de los genes regulados por las auxinas, de igual forma existen proteínas de membrana que han sido implicadas en la entrada y salida de las auxinas, entre ellas la familia de proteínas PIN (PIN-FORMED), las cuales controlan la salida de auxinas de las células (Berleth *et al.*, 2004).

Las auxinas actúan a través de un receptor citoplásmico codificado por el gen TIR1, cascada abajo del receptor, la señal es transducida por factores de transcripción que pertenecen a dos familias, los AUXIN RESPONSE FACTORS (ARF) y los factores

AUXIN/IAA (Aux/IAA). Los ARF se consideran represores transcripcionales, mientras que las proteínas Aux/IAA se unen directamente con los ARF activándolos y por consiguiente inhibiendo la transcripción de los genes. Se ha reportado que TIR1 contiene un dominio F-box, lo que sugiere que está involucrado en la degradación de proteínas mediante la ubiquitinación, la cual es llevada a cabo por los complejos Skp1/Cullin/F-box (SCF) que ubiquitina las proteínas blanco haciéndolas sustratos de la degradación por los proteosomas. Así, las auxinas promueven la ubiquitinación de los factores Aux/IAA por el SCR^{TIR1}, para que este sea degradado por el proteosoma, permitiendo la liberación de los ARFs de los efectos represivos de las proteínas Aux/IAA para activar la transcripción de los genes inducibles por auxinas (Woodward y Bartel, 2005b).

Citocininas.

Las citocininas son derivados de la adenina sustituidos en el N₆ que han sido reconocidas por mucho tiempo como un grupo de compuestos que afectan casi todos los aspectos del desarrollo y fisiología de las plantas.

Las citocininas se producen en las raíces y en los frutos jóvenes, así como en las semillas y son transportados entre los diferentes órganos a través del xilema. Entre estos compuestos el más activo es la kinetina (Figura 2) (Li *et al.*, 2006).

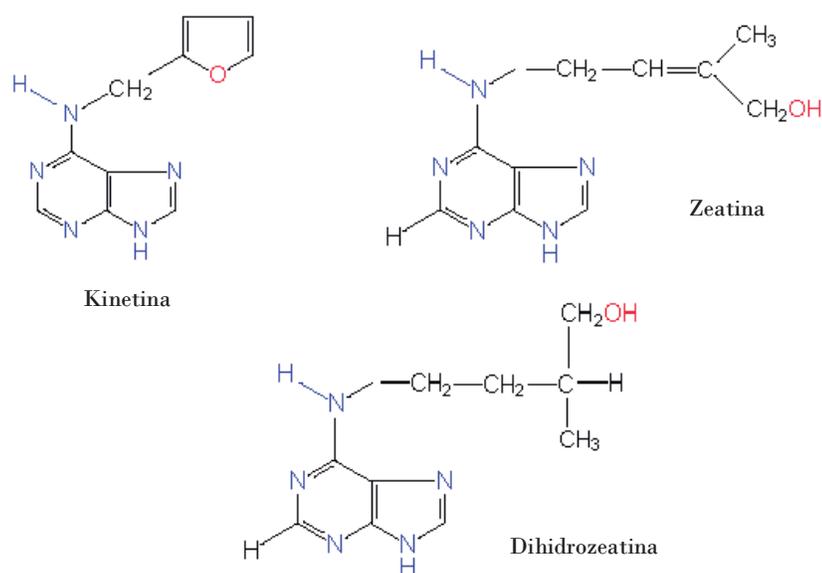


Figura 2. Estructura química de las citocininas.

Las citocininas reducen la senescencia, estimulan la germinación, estimulan la síntesis de auxinas, promueven la división celular, diferenciación de cloroplastos, formación de raíces adventicias y regeneración de órganos, dominancia apical, desarrollo vascular, respuesta a patógenos y movilidad de nutrientes. Todos estos numerosos papeles de las citocininas en plantas, aunado a la imposibilidad de aislar mutantes con niveles de citocininas indetectables, indican cuan importantes son estas hormonas para las plantas (Kakimoto, 2003; Higuchi *et al.*, 2004; Rashotte *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006).

Estudios recientes han empezado a elucidar los elementos involucrados en el modo de acción de las citocininas. Los receptores de las citocininas están codificados por miembros de una familia de genes en *Arabidopsis* que es similar a los sistemas de dos componentes de histidina-cinasas de bacterias y son llamados AHK2, AHK3 (*Arabidopsis HK gene family*) y CRE1 (*Cytokinin Response 1*). La activación de los receptores por las citocininas resulta en la fosforilación de las proteínas AHP las cuales se mueven del citoplasma al núcleo y transfieren la molécula de fosfato a los

factores transcripcionales *Arabidopsis Response Regulators* (ARRs), de los cuales existen en *Arabidopsis* 30 genes que codifican para proteínas ARR o proteínas ARR-like; estos se dividen en tres clases de ARR, tipo A, B y pseudo-ARRs. Los ARR tipo A tienen un dominio myb-like (dominio receptor), se activan rápidamente con las citocininas y son reguladores negativos de la ruta de transducción de la señal, mientras los de tipo B además del dominio receptor, tienen un dominio C-terminal que funciona como un dominio de unión a DNA y de activación transcripcional de los genes de respuesta a citocininas y su transcripción no se ve elevada en respuesta a las citocininas. Aunque los pseudo-RRs tienen el dominio receptor, al dominio activador le falta un residuo de aspartato crítico para su función (D'Agostino *et al.*, 2000; Che *et al.*, 2002; Kakimoto, 2003; Higuchi *et al.*, 2004; Rashotte *et al.*, 2005).

Interacción entre auxinas y citocininas.

La interacción entre las auxinas y las citocininas es importante para el adecuado crecimiento y desarrollo de las plantas. De hecho, el descubrimiento de las citocininas ocurrió gracias a su interacción con las auxinas ya que juntas promueven la división celular en sistemas de cultivo de tejidos. Los primeros estudios indicaban que concentraciones diferentes de citocininas con respecto a auxinas determinan el tipo de órganos que serían regenerados a partir de callos indiferenciados en cultivos *in vitro* (Skoog y Miller, 1957).

Esto ha sido verificado recientemente al establecerse un medio inductor de callos (CIM) que consiste de una solución nutritiva que contiene una concentración equivalente entre auxinas y citocininas. Al tratar explantes de *A. thaliana* con este medio se producen callos, o masas de células indiferenciadas. Al aumentar la concentración de auxinas sobre la de citocininas se obtiene un medio inductor de raíces (RIM); por el contrario, al aumentar la concentración de citocininas sobre la de auxinas se obtiene un medio inductor de brotes (SIM). Estos resultados combinando diferentes niveles de auxinas y citocininas nos indica que efectivamente

la interacción entre ambos RC es importante para la organogénesis vegetal (Che *et al.*, 2002; Howell *et al.*, 2003).

Nuevas moléculas señal.

En años recientes se han descubierto nuevas moléculas señal, cuyo efecto en procesos celulares ya había sido descrito en sistemas animales, incluyendo el L-glutamato, un aminoácido del cual se conoce su capacidad de modificar el crecimiento de las raíces de *Arabidopsis*. Del mismo modo, el óxido nítrico es capaz de modificar el número de raíces adventicias que produce *Arabidopsis*. Más recientemente, otros compuestos como las poliaminas, el ácido salicílico y el péptido sistemina han sido añadidos a la lista de potenciales hormonas vegetales (Pagnussat *et al.*, 2002; Walch-Liu *et al.*, 2006; Morquecho-Contreras y López-Bucio, 2007).

De especial interés han sido los lípidos en las plantas, como las *N*-aciletanolamidas y las alcanidas debido a que sus contrapartes en mamíferos, no actúan solamente como componentes estructurales de las membranas sino también como moléculas señal (López-Bucio *et al.*, 2006; Morquecho-Contreras y López-Bucio, 2007).

N-aciletanolamidas.

Las *N*-aciletanolamidas o NAEs fueron identificadas en los años 50's como constituyentes de la lecitina de soya y los cacahuates. La actividad biológica de estos compuestos en las plantas y su papel como agentes antiinflamatorios en animales ha sido el objeto de investigaciones recientes (Chapman, 2004).

Las NAEs son compuestos de identidad lipídica, constan de una cadena hidrocarbonada que puede tener hasta 20 átomos de carbono, con diferente grado de insaturación, unida a un grupo amida y a una cadena lateral que porta un etanol (Fig. 3).

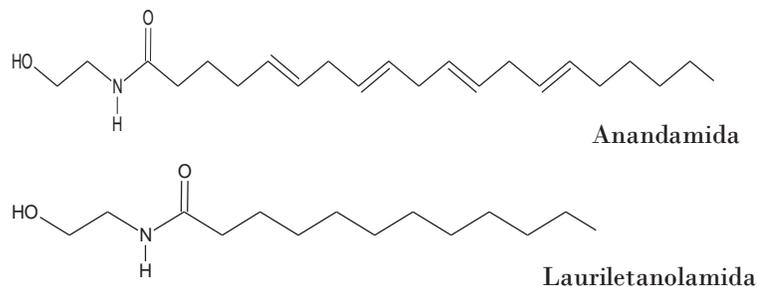


Figura 3. Estructura química de las *N*-aciletanolamidas.

Una de las NAEs más conocidas es la anandamida o *N*-araquidonil-etanolamida, (NAE 20:4) (Fig. 3). En sistemas animales esta sustancia ha cobrado importancia por tener actividad como un neurotransmisor y neuromodulador y por regular algunos comportamientos como la alimentación, el miedo y la ansiedad. Ahora está bien establecido que la anandamida y otras NAEs poli-insaturadas se unen a los receptores cannabinoides CB1 y CB2, en tanto que las NAEs saturadas o monoinsaturadas no son capaces de hacerlo (Alger, 2004; Grotenhermer, 2006; Berdyshev *et al.*, 2001).

En las plantas, las NAEs se han cuantificado en semillas de diferentes especies. En el maíz y el algodón el contenido total de NAEs varía entre 0.5 y 2.0 µg/g de peso fresco. En las semillas de *A. thaliana* se encuentran hasta en cantidades de 1.206 µg/g de peso fresco, siendo las más abundantes las NAEs 16:0 y 18:2 aunque las NAEs 14:0 y 12:0 se encuentran en cantidades detectables (Chapman, 2004).

Cabe mencionar que los niveles de NAEs identificados en las semillas disminuyen significativamente después de la imbibición y la germinación lo cual indica que su catabolismo es un pre-requisito para la germinación y el crecimiento post-embrionario (Wang *et al.*, 2006).

El tejido vegetativo de las plantas tiene niveles más bajos de NAEs en comparación con las semillas y difieren en que en estos tejidos predominan la NAE 12:0 y NAE 14:0, lo cual evidencia que en los tallos y hojas predominan las NAEs de cadena

mediana y que también éstas son sintetizadas a demanda en vez de ser acumuladas. Esta acumulación en las hojas parece ser importante en la defensa de las plantas contra ataques por herbivoría o patógenos y en respuestas protectoras a estrés abiótico (Chapman, 2004; López-Bucio *et al.*, 2006; Morquecho-Contreras y López-Bucio, 2007).

Alcamidas.

Las alcamidas fueron considerados inicialmente como metabolitos secundarios que comprenden mas de 200 compuestos relacionados entre si. Estos compuestos están presentes en varias familias de plantas entre ellas: Aristolochiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Convolvulaceae, Euphorbiceae, Menispermaceae, Peperaceae, Poaceae, Rutaceae y Solanaceae. El interés por estos compuestos ha ido en aumento por su gran variedad de actividades biológicas. Algunas especies vegetales que acumulan estos compuestos han sido utilizados como plantas medicinales por diferentes civilizaciones, pero hasta recientemente se desconocía la función biológica de los mismos para las plantas (Ramírez-Chávez *et al.*, 2004).

Entre las plantas que contienen alcamidas en sus tejidos están *Echinacea purpurea*, *Echinacea angustifolia* y *Heliopsis longipes*, comúnmente los extractos de estas plantas son utilizados para el tratamiento del resfriado común e infecciones de las vías respiratorias y se ha estudiado la posibilidad de que este efecto ocurra por la interacción de las alcamidas con el sistema inmune aunque esto todavía es cuestionable (Ramírez-Chávez *et al.*, 2004; Raduner *et al.*, 2006).

En las raíces de *Heliopsis longipes* (Fig. 4a), García-Chávez y col. en el 2004 encontraron un contenido total de alcamidas de 9.369 µg/g de peso seco de raíz repartido en 8 compuestos, de los cuales en cuanto a longitud de cadena prevalecían las decamidas (alcamidas de 10 átomos de carbono) seguidas por las undecamidas (11 átomos de carbono). La alcamida mayoritaria es la afinina, que se encuentra hasta

en 1% de peso fresco y a ella se le atribuyen los efectos específicos observados a estas raíces, entre los que se pueden considerar su acción como anestésico local, el estímulo organoléptico, así como su actividad insecticida y bactericida, por lo que se considera que las alcanidas deben constituir un elemento de defensa contra herbivoría y ataques de patógenos de las plantas que las contienen (García-Chávez *et al.*, 2004; Ramírez-Chávez *et al.*, 2004).

Las alcanidas (Fig. 4 b-c) varían en su estructura con las NAEs por la carencia del grupo –OH en la cadena lateral, también se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza desde líquenes y actinomicetos hasta angiospermas. Por su similitud química con las NAEs y los esfingolípidos y su amplia distribución en la naturaleza resulta interesante estudiar más a fondo las posibles funciones de estos lípidos en las plantas (López-Bucio *et al.*, 2006).

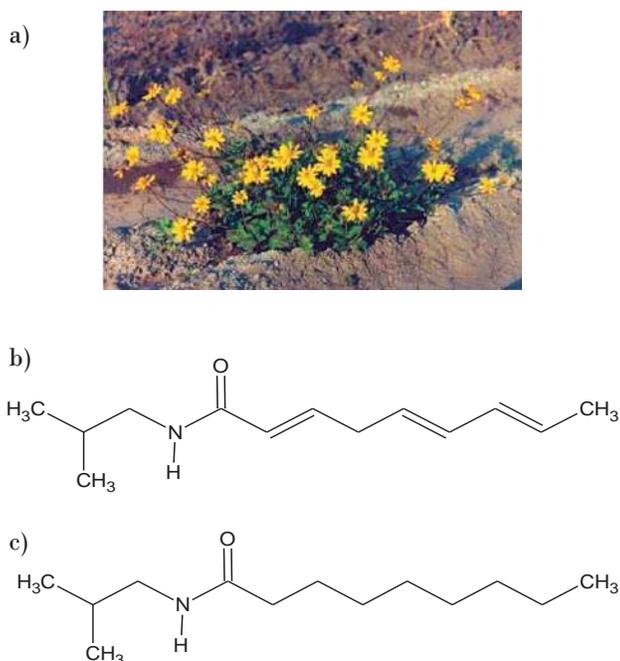


Figura 4. *Heliopsis longipes* y la estructura química de las alcanidas. (a). Fotografía de una planta de *Heliopsis longipes*, (b). Estructura de la *N*-isobutil-2E,6Z,8E-decatrienamida (afinina), (c). Estructura de la *N*-isobutil decanamida.

Efectos de las *N*-aciletanolamidas y alcanidas sobre *A. thaliana*.

Blancaflor y col. en el 2003 reportaron el efecto de diferentes NAEs sobre la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. En particular, la lauriletanolamida (NAE12:0) en concentración de 20 μM estimuló la proliferación de raíces laterales, que también eran más largas que las del control tratadas con ácido láurico. En una concentración de 50 μM se observó un 80% de inhibición del crecimiento de la raíz primaria que coincide con el crecimiento isodiamétrico de la región meristemática. Los efectos morfogenéticos fueron atribuidos a alteraciones en la división celular, organización endomembranal y tráfico de vesículas causado por la NAE12:0 (Blancaflor *et al.*, 2003).

En experimentos en los cuales las plantas son germinadas en medio libre de NAE 12:0 para después de un tiempo determinado ser pasadas a medio con 50 μM de este compuesto, se aprecia que el crecimiento de la raíz primaria fue inhibido significativamente a partir de las 3 h, lo cual sugiere que el compuesto ejerce su efecto a corto plazo. Con estos resultados resalta la capacidad de esta molécula de afectar varios aspectos del desarrollo post-embrionario de la planta (Blancaflor *et al.*, 2003).

Existen dos reportes en la literatura que indican que las alcanidas también son capaces de modificar el crecimiento de las plantas y que tendrían un papel importante en el crecimiento y desarrollo. En el primer reporte se estudió el efecto de la amidinina, una alcanida aislada del actinomiceto *Amycolatopsis sp*, en el crecimiento de plantas de arroz (*Oriza sativa*). Se observó que la aplicación de este compuesto en concentraciones de 6 hasta 18 μM estimula en un 20% la producción de biomasa foliar y hasta en un 50% la biomasa radicular. En concentración de 60 μM la amidinina mostró un efecto represor del crecimiento tanto de la raíz como del follaje (Kanbe *et al.*, 1993).

El segundo reporte corresponde a investigaciones en que se analizaron los efectos de la afinina, la alcanida mayoritariamente presente en las raíces de *Heliopsis longipes*, sobre el crecimiento y desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Se encontró que este compuesto altera el desarrollo vegetal de una manera dosis-dependiente. En bajas concentraciones (7 - 14 μM) se observa una estimulación del crecimiento de la raíz primaria y de la formación de raíces laterales, mientras que en concentraciones más altas (28 y 56 μM) se observa una inhibición del crecimiento de la raíz primaria y de las raíces laterales. Otro de los efectos encontrados por la adición de afinina al medio es la estimulación del crecimiento de los pelos radiculares (Ramírez-Chávez *et al.*, 2004). Estos efectos morfogénéticos son similares a los producidos por las auxinas, ya que es ampliamente sabido que estas fitohormonas producen un efecto estimulador en la formación de las raíces laterales y de los pelos radiculares.

La información anteriormente presentada sugiere que probablemente las NAEs y las alcanidas puedan ser nuevos reguladores del crecimiento vegetal, con un mecanismo de señalización independiente del de otras fitohormonas o bien que sus efectos ocurren mediante una interacción con las rutas de señalización de las auxinas o citocininas.

3. JUSTIFICACIÓN.

Las alcamidas y *N*-aciletanolamidas producen una respuesta morfogénica en *Arabidopsis thaliana* comparable a la de otras fitohormonas, por lo tanto es importante conocer los mecanismos de acción de estos compuestos

4. HIPÓTESIS.

En *Arabidopsis thaliana* las alcamidas y las *N*-aciletanolamidas alteran el crecimiento y desarrollo mediante un mecanismo de acción independiente de auxinas y citocininas.

5. OBJETIVO GENERAL.

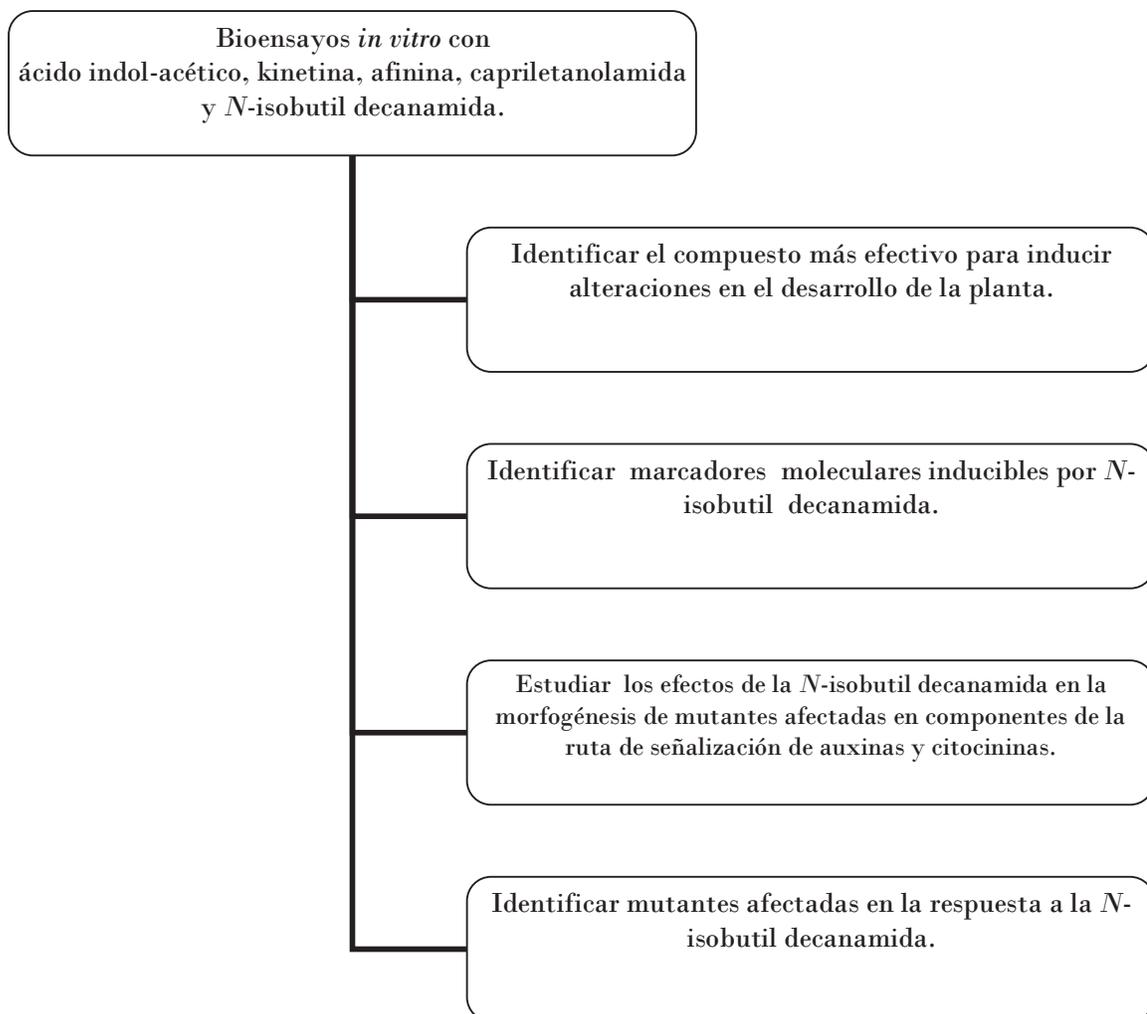
Caracterizar los efectos de la afinina, *N*-isobutil decanamida y capriletanolamida (NAE 10:0) sobre el desarrollo de *Arabidopsis thaliana* y analizar sus posibles mecanismos de acción.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 6.1. Comparar los cambios morfogénéticos que ocurren en la raíz y el follaje de *A. thaliana* producidos por el ácido indol acético, kinetina y los compuestos afinina, capriletanolamida y *N*-isobutil decanamida.
- 6.2. Identificar marcadores moleculares inducibles por la *N*-isobutil decanamida.
- 6.3. Estudiar los efectos de la *N*-isobutil decanamida en la morfogénesis de mutantes afectadas en componentes de la ruta de señalización de auxinas y citocininas.
- 6.4. Identificar mutantes de *A. thaliana* afectadas en la respuesta morfogénética a la *N*-isobutil decanamida.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

Estrategia general



8. MATERIALES Y MÉTODOS.

8.1. Material biológico.

Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Col-0. En la tabla 1 se enlistan las líneas transgénicas de *A. thaliana* que expresan genes reporteros cuya expresión fue evaluada en los diferentes tratamientos con alcamidas.

Tabla 1. Marcadores moleculares utilizados.

Marcador	Características	Referencia
DR5::GUS	Marcador inducible por auxinas	Ulmasov <i>et al.</i> , 1997
BA3::GUS	Marcador inducible por auxinas	Oono <i>et al.</i> , 1998
ARR1::GUS	Marcador de respuesta a citocininas	Mason <i>et al.</i> , 2004
ARR10::GUS	Marcador de respuesta a citocininas	Mason <i>et al.</i> , 2004
ARR12::GUS	Marcador de respuesta a citocininas	Mason <i>et al.</i> , 2004
ARR5::GUS	Marcador de respuesta a citocininas	D'Agostino <i>et al.</i> , 2000
CycB1::GUS	Marcador de ciclo celular	Colón-Carmona <i>et al.</i> , 1999
pCycD3::GUS	Marcador de ciclo celular	Rivera-Bustamante <i>com. per.</i>
QC46::GUS	Marcador del centro quiescente	Sabatini <i>et al.</i> , 1999
pExo::GUS	Marcador de división celular en el meristemo radicular	Farrar <i>et al.</i> , 2003
Bop1::GUS	Marcador de diferenciación y desarrollo en el follaje	Norberg <i>et al.</i> , 2005
Bop2::GUS	Marcador de diferenciación y desarrollo en el follaje	Norberg <i>et al.</i> , 2005

Las mutantes afectadas en la ruta de señalización de auxinas y citocininas se enlistan en la Tabla 2.

Tabla 2. Mutantes afectadas en la ruta de señalización de auxinas y citocininas.

Resistentes a auxinas:	Resistentes a citocininas :
<i>aux 1-7</i> (Pickett <i>et al.</i> , 1990).	<i>ahk 2</i> (Higuchi <i>et al.</i> , 2004).
<i>iaa 28</i> (Rogg <i>et al.</i> , 2001).	<i>ahk 3</i> (Higuchi <i>et al.</i> , 2004).
<i>slr 1</i> (Fukaky <i>et al.</i> , 2002).	<i>cre 1</i> (Higuchi <i>et al.</i> , 2004).
<i>doc 1</i> (Li <i>et al.</i> , 1994).	<i>cre 1/ahk 2</i> (Higuchi <i>et al.</i> , 2004).
<i>eir 1</i> (Roman <i>et al.</i> , 1995).	<i>cre 1/ahk 3</i> (Higuchi <i>et al.</i> , 2004).
	<i>ahk 2/ahk 3</i> (Higuchi <i>et al.</i> , 2004).
	<i>rpn 12</i> (Smalle <i>et al.</i> , 2002).

La semilla mutagenizada que se utilizó en el escrutinio para aislar mutantes afectadas en la respuesta a la *N*-isobutil decanamida fue adquirida en la casa comercial Lehle seeds (Lehle Seeds, Round Rock TX, USA). Esta semilla consiste de 6 grupos parentales (M2) de las cuales se sembraron aproximadamente 12,000 semillas en medio con *N*-isobutil decanamida para identificar mutantes resistentes o hipersensibles al compuesto mediante un análisis visual del crecimiento.

Condiciones de crecimiento.

Las semillas fueron desinfectadas superficialmente con etanol al 70% v/v durante 5 min. y luego con hipoclorito de sodio al 20% v/v durante 7 min. Al terminar se dan 5 enjuagues con agua destilada estéril. En todos los casos se realizaron bioensayos *in vitro* en cajas de Petri con 30 ml de medio de Murashige y Skoog (MS), al 0.2x, el cual contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de *A. thaliana*. El medio tiene un pH de 7.0, 0.6 % de sacarosa y 1% de agar.

El medio base contiene 2.0 mM NH_4NO_3 , 1.9 mM KNO_3 , 0.3 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.15 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 μM KI , 25 μM H_3BO_3 , 0.1 mM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.3 mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 μM $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.1 μM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 mM $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, inositol ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) y Gly ($0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

Las alcamidas fueron gentilmente donados por el laboratorio del Dr. Jorge Molina del CINVESTAV, Unidad Irapuato. La pureza de estos compuestos es mayor al 99%, según se verifica por cromatografía de gases-masas (GC-MS) (Molina-Torres, Com. Per.). La afinina, la *N*-isobutil decanamida y la capriletanolamida se preparan diluidos en etanol absoluto, por lo que a todos los controles se les añade etanol absoluto en un volumen equivalente a la concentración mas alta del compuesto en el bioensayo. La kinetina (citocinina natural) y el AIA (auxina natural) se adquirieron en la casa comercial Sigma (Sigma Aldrich, St. Louis MI, USA).

Para el caso del escrutinio de mutantes, estas fueron sembradas en medio con 42 μM de *N*-isobutil decanamida y se dejaron crecer durante 14 días para después evaluar los fenotipos mutantes.

Todos los tratamientos se realizaron por triplicado con 10 semillas en cada placa. Las plantas se crecieron en condiciones controladas en una cámara Percival AR95 (Percival Scientific, Inc. Perry IA, USA), con una temperatura de 22° C y una humedad de 80%, con un fotoperiodo de 16 h. de luz y 8 h de oscuridad, lo que permite que la planta crezca en óptimas condiciones. Finalmente, las plantas se colocan dentro de la cámara con una inclinación de 60° aproximadamente lo cual permite que la raíz de la planta crezca sobre el medio.

8.3. Análisis histológico de la actividad de β -glucuronidasa.

La actividad de la β -glucuronidasa se evaluó en plantas de las diferentes líneas transgénicas de *A. thaliana* a los 7 días después de la germinación. Las plantas se incuban en placas de microtítulo conteniendo 300 μ l de un amortiguador de reacción de GUS (Kit GUS-S, Sigma-Aldrich, St. Louis MI, USA). Este amortiguador contiene el sustrato de la enzima β -glucuronidasa (X-Gluc) y Ferricianuro de Potasio 5 μ M disuelto en solución de fosfatos. Las plantas fueron incubadas a 37 °C durante 12 h, hasta desarrollar una coloración azul índigo correspondiente a la actividad de GUS. Posteriormente fueron clarificadas bajo el método de Malamy y Benfey (1997). Para cada línea transgénica se analizaron por lo menos 10 plantas de cada tratamiento, de las cuales se eligieron 3 plantas representativas para ser fotografiadas, en dos zonas principales como son el meristemo apical, y el follaje, además del meristemo radicular y la zona de elongación, con un microscopio óptico usando la técnica de Nomarski.

8.4. Variables de crecimiento.

Las variables de crecimiento y desarrollo que se analizaron en los siguientes bioensayos fueron la longitud de la raíz primaria, el número de raíces laterales por planta, la densidad de raíces laterales y las modificaciones en el follaje, todas a los 10 días después de la germinación. En cuanto al análisis del crecimiento de las mutantes resistentes tanto a auxinas como a citocininas se utilizó como principal marcador el crecimiento de la raíz primaria. Para el escrutinio de mutantes afectadas en la respuesta a la *N*-isobutil decanamida se identificaron los fenotipos de interés por la longitud de su raíz primaria y la formación de callos en el follaje.

8.5. Análisis de datos.

La longitud de la raíz primaria se cuantificó con una regla de plástico, realizándose mediciones de al menos 30 plantas provenientes de 3 cajas independientes. Las raíces laterales se analizaron con ayuda de un microscopio estereoscópico Leica MZ6/L2 (Leica Microsystems, Wetzlar Germany) en el objetivo de 0.8x, se contabilizaron las raíces de por lo menos 8 plantas de cada una de las 3 placas de cada tratamiento. La densidad de raíces laterales se obtiene dividiendo el número de raíces laterales entre la longitud de la raíz primaria y se expresa como el número de raíces laterales por centímetro.

Para todos los experimentos los datos se analizaron con el programa Statistic 6.0, se graficaron las medias de cada tratamiento con el error estándar y para analizar la validez de los resultados encontrados se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA de una vía) seguida por una prueba post-hoc de Tukey.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

9.1. Efecto del ácido indol acético en el desarrollo de la raíz de *A. thaliana*.

Para establecer si los efectos de las alcaloides sobre el desarrollo de *A. thaliana* son similares a los causados por las auxinas y las citocininas, se establecieron bioensayos *in vitro*, en los que se evaluaron los efectos de diferentes concentraciones de ácido indolacético, kinetina y diferentes alcaloides en el crecimiento de las plantas.

En la Fig. 5 se muestran placas representativas con plantas de 10 ddc, tratadas con diferentes concentraciones de ácido indol-acético (AIA). En el control observamos el sistema radical de *A. thaliana* que consiste en una raíz primaria larga con formación de raíces laterales en la región más proximal a la base del tallo. En las concentraciones de 0.001 y 0.005 no se registra una disminución en el crecimiento de la raíz primaria. En las concentraciones de 0.01, 0.05 y 0.1 de AIA se observó una disminución gradual del crecimiento de la raíz primaria, que estuvo acompañado por un mayor número de raíces laterales.

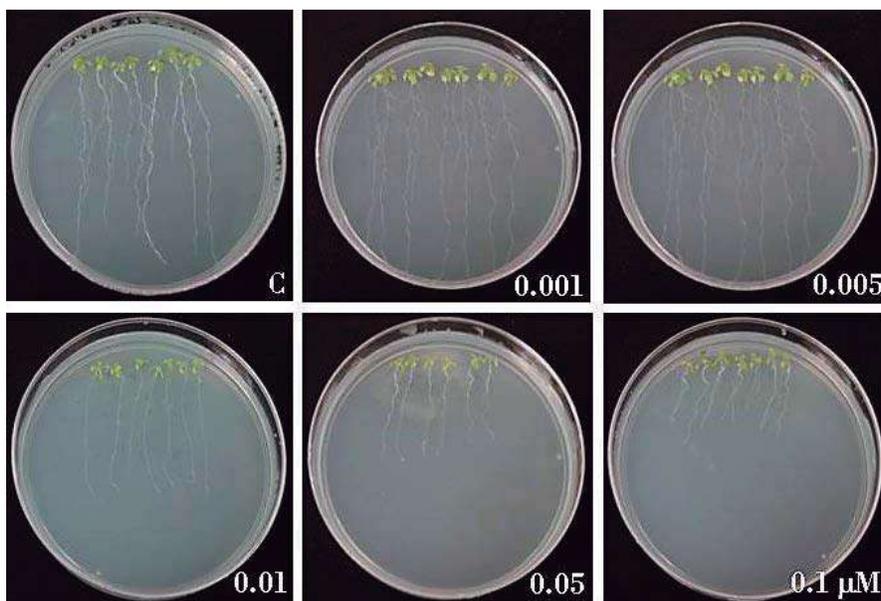


Figura 5. Efecto del ácido indolacético sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de *A. thaliana*. Plantas de 10 días después de la germinación del ecotipo Col-0, tratadas con diferentes concentraciones micromolares de AIA , además del control (C) que no contiene la hormona.

Los resultados del crecimiento de la raíz primaria a los 10 días después de la germinación en los tratamientos con AIA se presentan de manera gráfica en la Fig. 6 en donde queda de manifiesto que las dos primeras concentraciones analizadas no muestran inhibición en el crecimiento y donde observamos que a partir de $0.01 \mu\text{M}$ vemos una caída gradual en el crecimiento de la raíz primaria en tanto al analizar el porcentaje de inhibición (datos no mostrados) este va aumentando conforme aumenta la concentración, así tenemos que en la concentración de $0.01 \mu\text{M}$ se obtuvo una inhibición del 17%; a la concentración de $0.05 \mu\text{M}$ la inhibición es de 43%, hasta llegar a una inhibición del 77% en la concentración de $0.1 \mu\text{M}$.

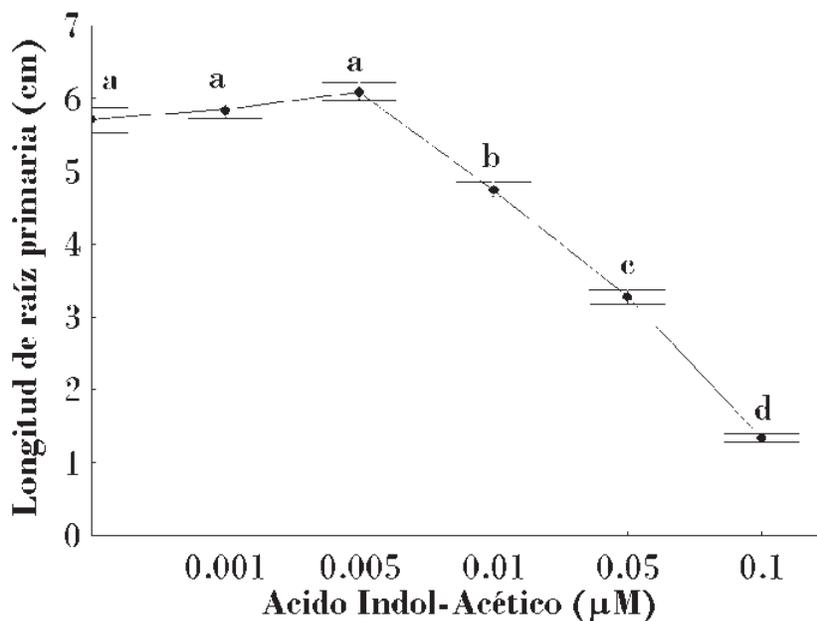


Figura 6. Efecto de los tratamientos con AIA sobre la arquitectura de la raíz de *A. thaliana* en plantas de 10 días después de la germinación del ecotipo Col-0.

Los resultados obtenidos con el AIA son similares a los ya reportados para esta y otras auxinas, ya que es ampliamente conocido que las auxinas promueven la formación de raíces laterales e inhiben el crecimiento de la raíz primaria.

9.2. Efecto de la kinetina en el crecimiento de la raíz primaria.

Aunque está descrito que las citocininas son reguladores importantes del ciclo celular en las plantas, se sabe muy poco sobre las respuestas morfológicas que estos RC modifican. A continuación se evaluaron los efectos de la aplicación de kinetina en el desarrollo del sistema radical de *A. thaliana*. En la Fig. 7 se puede observar que las plantas control presentan un crecimiento indeterminado o pivotante. En las concentraciones de 0.5 y 1 μM observamos una estimulación del crecimiento de las raíces laterales y la alteración en el gravitropismo. Dosis mayores del compuesto inhibieron drásticamente la formación de raíces laterales y el crecimiento de la raíz primaria.

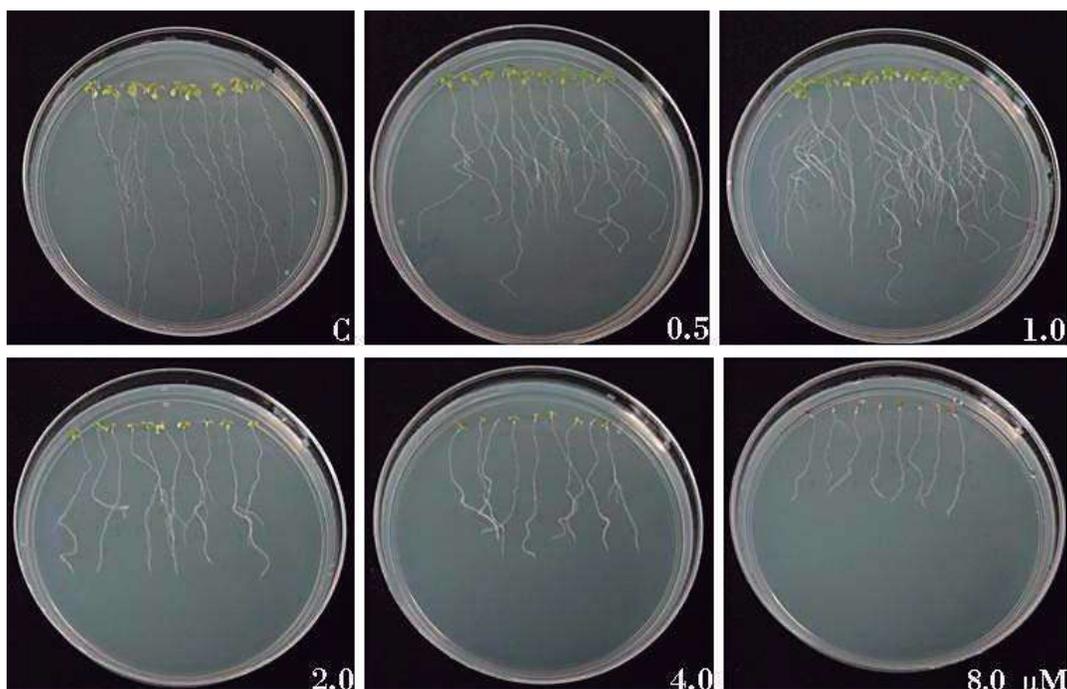


Figura 7. Efecto de la kinetina sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de *A. thaliana*. Plantas del ecotipo Col-0 a los 10 días después de la germinación tratadas con diferentes concentraciones de kinetina, además del control (C) que no contiene la hormona.

Los resultados para la longitud de la raíz primaria se presenta en la Fig. 8. En esta gráfica se puede observar claramente la inhibición del crecimiento de la raíz primaria desde la concentración de $0.5 \mu\text{M}$ en donde es del 29%; en la concentración de $1 \mu\text{M}$ es de 36 %, este porcentaje aumenta en la concentración de $2 \mu\text{M}$ en donde es de 42% mientras que a $4 \mu\text{M}$ es de 46%, hasta llegar a la máxima concentración probada que fue de $8 \mu\text{M}$ y cuyo porcentaje de inhibición llegó a ser del 61%.

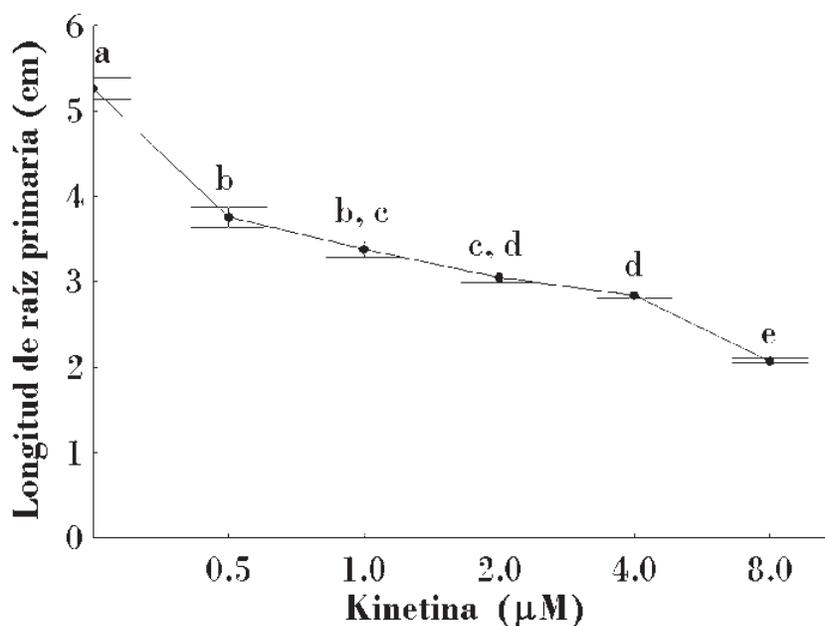


Figura 8. Efecto de la kinetina en la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana* en plantas de 10 días después de la germinación.

Los efectos inhibitorios de la kinetina a estas concentraciones en la formación de las raíces laterales sugieren que las citocininas actúan como represoras de este proceso, sin embargo, los efectos en concentraciones menores indican que las citocininas pueden estimular el crecimiento de las raíces laterales. Estos resultados son novedosos y claramente muestran que los efectos de la kinetina son diferentes a los de las auxinas en la regulación de la arquitectura radical.

9.3. Efecto de la afinina sobre la arquitectura de la raíz de *A. thaliana*.

La afinina es la alcanida más abundante en la raíz de *Heliopsis longipes*. Estudios previos indican que este compuesto regula el desarrollo de la raíz de manera dependiente a su concentración en el medio. Para realizar un estudio comparativo de los efectos de diferentes alcanidas en el desarrollo, primero se procedió a evaluar los efectos de la afinina sobre la arquitectura de la raíz en bioensayos *in vitro* (Fig. 9).

En la Fig. 9a se observa que a una concentración de 10 μM se afecta de manera significativa el crecimiento de la raíz primaria en donde la inhibición corresponde a un 14% y que a partir de esta concentración la inhibición fue aumentando a medida que la concentración también aumentó, siendo de un 21% en la concentración de 20 μM del compuesto; de 36% a la concentración de 40 μM ; mientras que a la concentración de 80 μM la inhibición llegó a ser de 58%, hasta llegar a la concentración de 160 μM donde el máximo de inhibición fue del 68%.

En estos experimentos se observó un aumento gradual en el número de raíces laterales formadas dependiente de la concentración de afinina (Fig. 9b), hasta llegar a un nivel máximo en la concentración de 80 μM en donde este número aumentó 4 veces en comparación con las plantas control, en tanto que en la concentración máxima utilizada que fue de 160 μM se observó una disminución en la formación de raíces laterales en relación a la concentración de 80 μM (Fig. 9b).

Al graficar la densidad de raíces laterales (número de raíces laterales por centímetro de raíz primaria), se aprecia como la afinina aumenta la densidad de acuerdo a su concentración en el medio desde 4, 6 hasta 10 y 12 veces, con las concentraciones de 20, 40, 80 y 160 μM respectivamente (Fig. 9c).

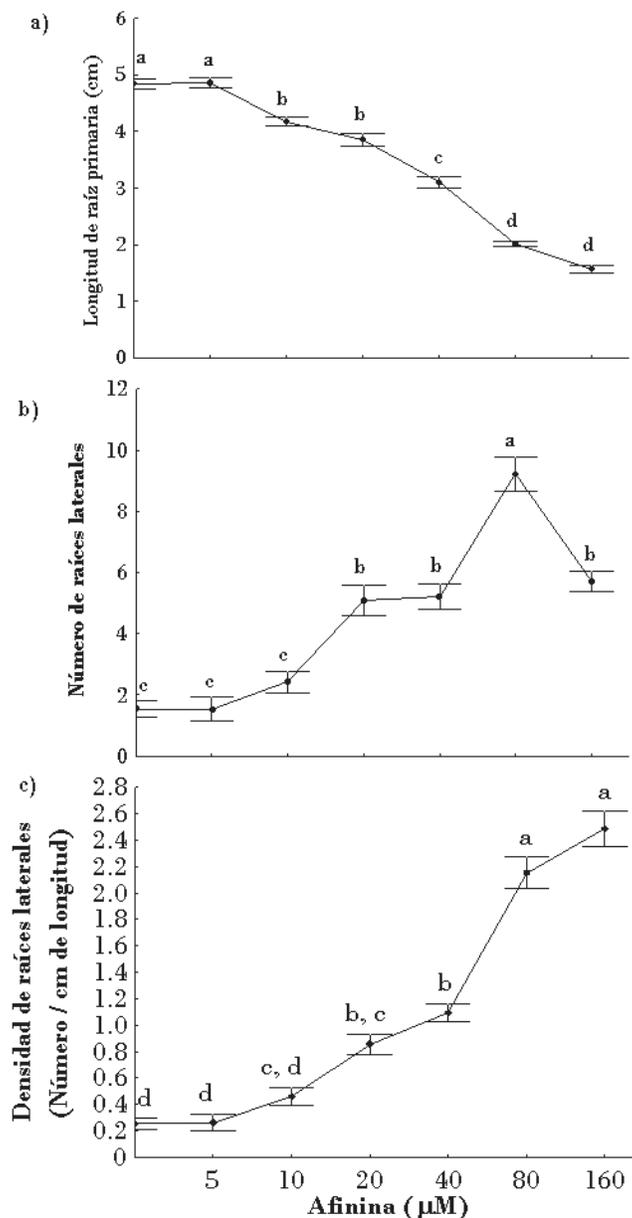


Figura 9. Efecto de la afinina sobre la arquitectura de la raíz de *A. thaliana* a los 10 días después de la germinación. a) Efecto de la afinina sobre la longitud de la raíz primaria. b) Número de raíces laterales por planta. c) Densidad de raíces laterales.

Estos resultados además de coincidir con lo reportado por Ramírez-Chávez y col., (2004) quienes reportaron que la afinina inhibe el crecimiento de la raíz primaria y estimula la formación de raíces laterales, apoyan la hipótesis de que la afinina podría tener un efecto promotor del crecimiento en las plantas.

9.4. Efecto de la capriletanolamida sobre la arquitectura de la raíz de *A. thaliana*.

Las *N*-aciletanolamidas son compuestos relacionados estructuralmente a las alcanidas que participan en la regulación del desarrollo vegetal. Para comparar los efectos de las *N*-aciletanolamidas con las alcanidas, se evaluaron los efectos de la capriletanolamida o NAE 10:0, un compuesto de longitud del ácido graso idéntica a la de la afinina y *N*-isobutil decanamida, con la única diferencia de poseer un hidroxilo en la cadena lateral asociada al grupo amido.

En la Fig. 10 se presentan los efectos de la NAE sobre la arquitectura de la raíz de *A. thaliana*, donde se observa un crecimiento normal de la raíz hasta la concentración de 28 μM , pero a partir de la concentración de 56 μM se observa una inhibición del 50% en el crecimiento de la raíz primaria con respecto al control (Fig. 10a). En la concentración de 112 μM en donde se observa una completa inhibición del crecimiento de la raíz primaria.

La cuantificación del número de raíces laterales por planta reveló que la NAE 10:0 ejerce un efecto positivo en la formación de raíces laterales. En los tratamientos se observó un aumento paulatino en el número de raíces laterales por planta el cual llegó a un máximo en la concentración de 28 μM donde se ve aumentado casi 3 veces en comparación al control. Este número disminuyó a niveles similares al control, en las concentraciones de 56 y 112 μM (Fig. 10b). En todas las concentraciones del compuesto se observa que la densidad de raíces laterales aumenta. Por ejemplo, en la concentración de 28 μM se registró un incremento de 3 veces en comparación con el control (Fig. 10c). La máxima estimulación se observó en la concentración de 56 μM en donde la densidad de raíces laterales aumenta casi 5 veces en comparación con el control. Los resultados del número y densidad de raíces laterales muestran que la afinina y la capriletanolamida muestran efectos semejantes sobre la formación de raíces laterales en *A. thaliana*.

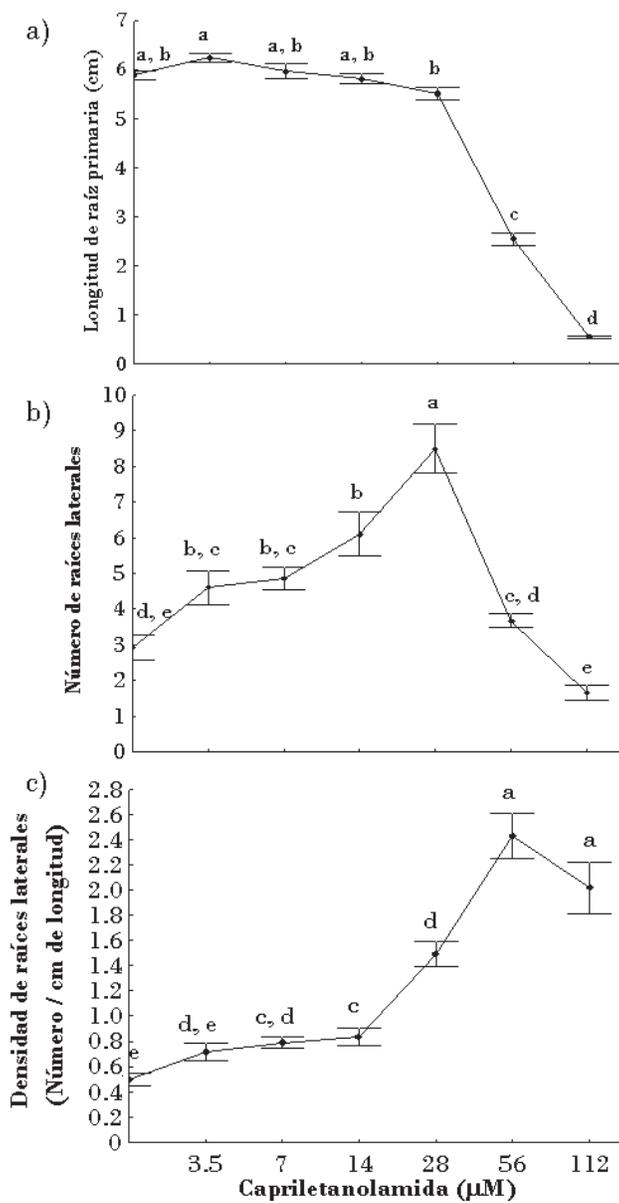


Figura 10. Efecto de la capriletanolamida sobre la arquitectura de la raíz de *A. thaliana* a los 10 días después de la germinación.

- a) Longitud de la raíz primaria. b) Número de raíces laterales por planta.
c) Densidad de raíces laterales.

9.5. Efecto de la *N*-isobutil decanamida sobre la arquitectura de la raíz de *A. thaliana*.

La *N*-isobutil decanamida es una alcanamida saturada que se obtiene por reducción catalítica de la afinina. Este es el compuesto con mayor similitud estructural con las NAEs saturadas. Aunque se ha reportado que este compuesto regula la formación de pelos radiculares en concentraciones nanomolares, no existe información detallada sobre los efectos de este compuesto en otros aspectos morfogénéticos.

La actividad biológica sobre el crecimiento de la raíz primaria de este compuesto se observa en la fig. 11, en donde se aprecia la disminución en la longitud de la raíz de manera constante al aumentar la concentración de *N*-isobutil decanamida (Fig. 11a); desde una inhibición del 10% en la concentración de 3.5 μM hasta una inhibición del 93% en las plantas crecidas en la concentración de 112 μM (Fig. 11a).

Así también, los tratamientos con *N*-isobutil decanamida incrementaron el número de raíces laterales por planta alcanzando su máximo efecto en la concentración de 14 μM (Fig. 11b). Los tratamientos con este compuesto aumentaron la densidad de raíces laterales desde 4 hasta 12 veces, en las concentraciones de 14 μM hasta la concentración de 56 μM en comparación con el control (Fig. 11c).

De esta forma, es evidente observar como la *N*-isobutil decanamida es una molécula que en menores concentraciones (3.5 μM) produce en las plantas efectos comparables con los de AIA y la kinetina.

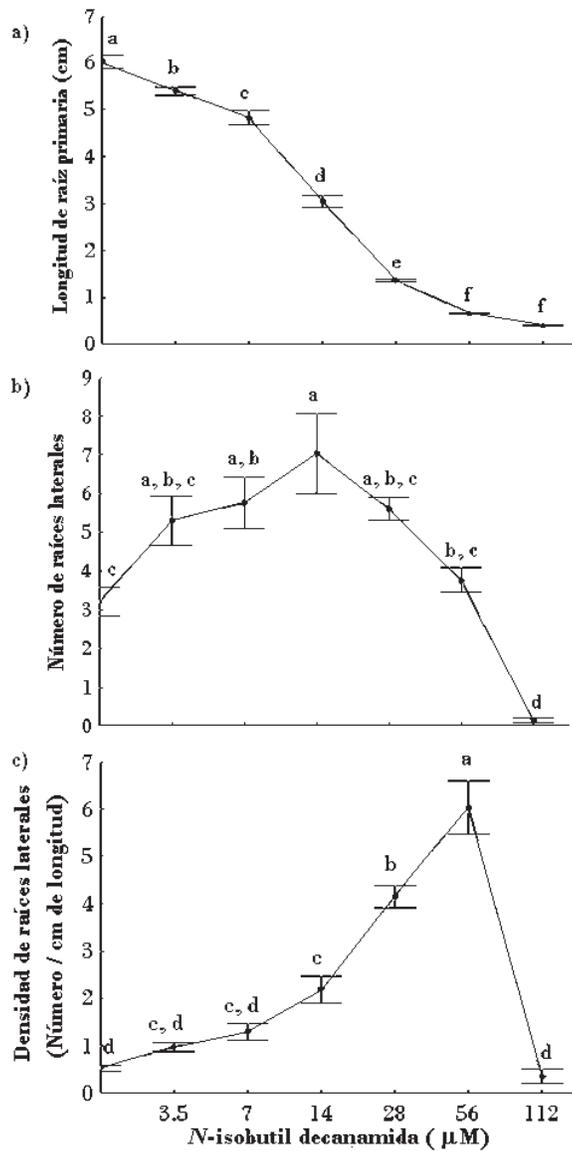


Figura 11. Efecto de la *N*-isobutil decanamida sobre la arquitectura de la raíz de *A. thaliana* de 10 días después de la germinación.

a) Longitud de la raíz primaria. b) Número de raíces laterales. c) Densidad de raíces laterales.

9.6. Comparación de los efectos de la afinina, capriletanolamida y *N*-isobutil decanamida sobre la longitud de la raíz primaria de *A. thaliana*.

Con el objetivo de comparar las curvas resultantes de los tratamientos con los tres diferentes compuestos analizados se construyó una gráfica en donde se muestra en el eje de las x las diferentes concentraciones de los compuestos probados y en el eje de las y la longitud de la raíz primaria en centímetros. Así podemos notar como las tres curvas son diferentes tanto en su pendiente como en los efectos que ejercen en el crecimiento de la planta (Fig. 12).

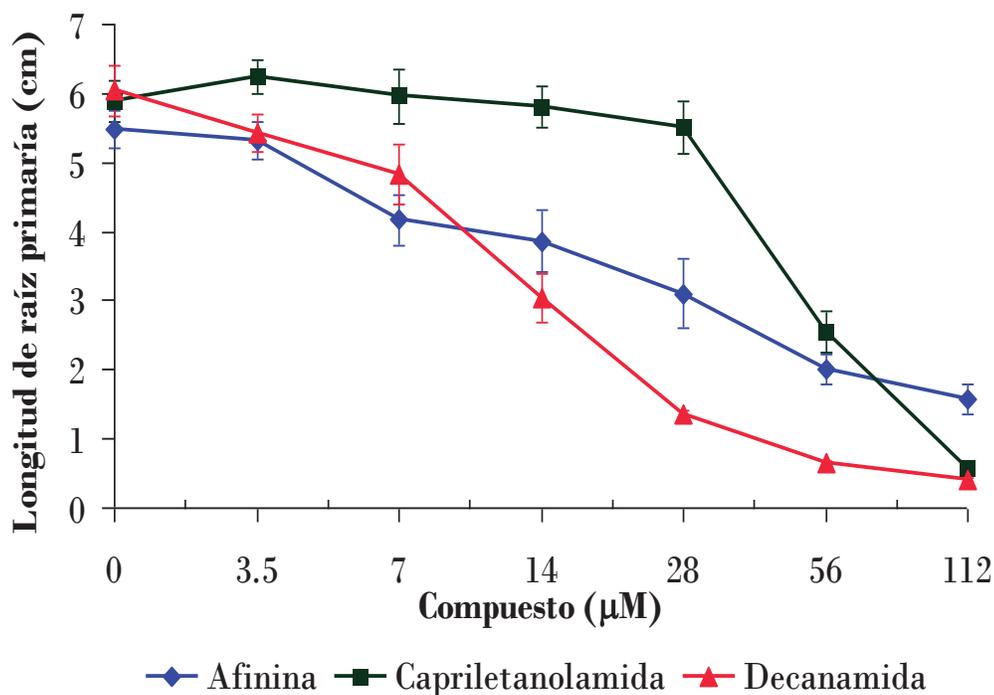


Figura 12. Comparación de las curvas resultantes de los tratamientos con afinina, capriletanolamida y *N*-isobutil decanamida para la longitud de la raíz primaria.

En la figura 12 se observa que la curva de la capriletanolamida (cuadros) tiene una pendiente muy diferente a las 2 restantes, esto se debe a que esta molécula requiere una concentración mucho mayor que las otras (56 μM) para inhibir significativamente el crecimiento de la raíz primaria.

Es importante hacer notar que en la concentración de 112 μM esta curva se une con la de *N*-isobutil decanamida lo que indica que puede llegar a tener los mismos efectos. Por otro lado, podemos ver que la curva de respuesta a la afinina (rombos) tienen una pendiente muy parecida a la de la *N*-isobutil decanamida principalmente en concentraciones menores, para después separarse, lo que nos hace pensar que también pueda llegar a tener los mismos efectos que la decanamida solo que a concentraciones mas altas, esto nos indica que las tres moléculas pueden llegar a ejercer los mismos efectos en el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana* solo que su efectividad no es la misma.

La curva de la *N*-isobutil decanamida (triángulos) es muy interesante ya que a diferencia de las otras, es una curva en la que se observa un efecto de dosis-respuesta en donde cada punto de la curva, nos da una longitud de raíz primaria mas pequeña, ya que la inhibición del crecimiento aumenta con la concentración del compuesto, hasta llegar a un nivel donde prácticamente la raíz ya no crece. En base a la comparación de las curvas, se puede concluir que la *N*-isobutil decanamida es el compuesto mas activo de los tres lípidos evaluados.

Existen varias alternativas para explicar estas diferencias, una de ellas es la efectividad de la planta para tomar estas moléculas del medio en el cual se encuentran diluidas, ya que aunque se trata de concentraciones micromolares bajas, es probable que solo logren entrar a la planta a concentraciones del orden nanomolar, esto aunado al transporte de estas moléculas el cual no podemos asegurar sea igual para todas ya que tienen pequeñas diferencias en su estructura química lo cual puede conferirles diferentes características que pudiese facilitar o incluso dificultar mas su transporte. Mientras que la capriletanolamida puede ser una molécula con mayor polaridad gracias al OH que tiene en la cadena lateral, lo cual puede impedir su difusión pasiva a través de las membranas plasmáticas de las células y por eso requerir una mayor concentración para lograrlo.

En el caso de la afinina y la *N*-isobutil decanamida al ser moléculas menos polares ya que no poseen el grupo OH como la anterior, sus curvas de crecimiento tienen una pendiente muy parecida y podrían ser transportadas con más facilidad que la capriletanolamida. El hecho de que las tres amidas causan efectos similares en las plantas pero a diferentes concentraciones puede explicarse por una posible interacción con un receptor común, aunque con distinta afinidad. Lo anterior es posible ya que se sabe que las *N*-aciletanolamidas interactúan con una proteína membranal llamada *NAE Binding Protein* (NBP), la cual tiene la capacidad de unirse a las NAE's y transducir la señal de estas al interior de la célula para provocar posibles cambios en la conformación de la membrana plasmática e incluso afectar la expresión de genes en la planta (Chapman, 2004).

9.7. Comparación de los efectos de las alcanamidas con auxinas y citocininas.

Tomando en cuenta la longitud de la raíz primaria, se calculó la concentración de los diferentes compuestos para inhibir en un 50% el crecimiento de la raíz primaria. En la Tabla 3 se observa que el compuesto más efectivo fue el AIA cuya dosis inhibitoria media fue de 0.06 μM . La kinetina inhibió en concentración de 7 μM y de los tres lípidos analizados, la *N*-isobutil decanamida fue la más activa al inhibir en dosis de 14 μM . Estos resultados indican que la decanamida actúa en concentraciones micromolares bajas, similares a las de la kinetina. Las concentraciones inhibitorias 50 de la afinina y la capriletanolamida no son muy diferentes entre sí lo cual indica que la presencia del hidroxilo o las insaturaciones son importantes para la actividad biológica de las NAEs y alcanamidas.

Tabla 3. Comparación de la actividad de los compuestos utilizados.

Compuesto	Concentración media inhibitoria (μM)
Ac. Indol acético	0.06
Kinetina	7.05
Decanamida	14.1
Capriletanolamida	49.44
Afinina	68.36

A partir de los datos presentados en la tabla 3, se seleccionó a la *N*-isobutil-decanamida para investigar los mecanismos de acción de este compuesto en las plantas.

9.8. Efectos de la *N*-isobutil decanamida en el follaje de *Arabidopsis thaliana*.

En todos los compuestos analizados, además de los efectos en la morfogénesis de la raíz, también se consideraron posibles alteraciones en el desarrollo del follaje. Tanto el AIA como la kinetina tuvieron efectos inhibitorios en el desarrollo del follaje que afectaron el tamaño de las plantas. Efectos similares se observaron con la afinina y la capriletanolamida, lo que indica que los diferentes reguladores probablemente inhiben el crecimiento celular a concentraciones altas. Una observación interesante en el caso de los tratamientos con *N*-isobutil decanamida fue la aparición de neoplasias en las hojas que dan lugar a estructuras similares a callos. En la figura 13 se observa el follaje normal de *A. thaliana* en donde vemos la zona meristemática en el centro de la roseta, de donde surgen los pecíolos que proyectan a las hojas hacia fuera (Fig. 13 a-c). Esta arquitectura normal del follaje prevaleció hasta la concentración de 28 μM .

En la concentración de 56 μM de *N*-isobutil decanamida se aprecian alteraciones en el follaje con el plegamiento de las hojas que da lugar a estructuras tipo corneta (Fig. 13 d-f). En esta concentración aparecen las neoplasias sobre las hojas, que se observan como masas de células transparentes. Estas proliferaciones se encuentran mucho mas grandes en tamaño en el tratamiento de 112 μM , al igual que el follaje es mucho más pequeño, en el cual ya no se pueden de distinguir las estructuras comunes del follaje de *A. thaliana* como son los pecíolos y las hojas (Fig. 13 j-l). Estas proliferaciones se presentan a los 21 días después de la germinación en aproximadamente 8 de cada 10 plantas analizadas.

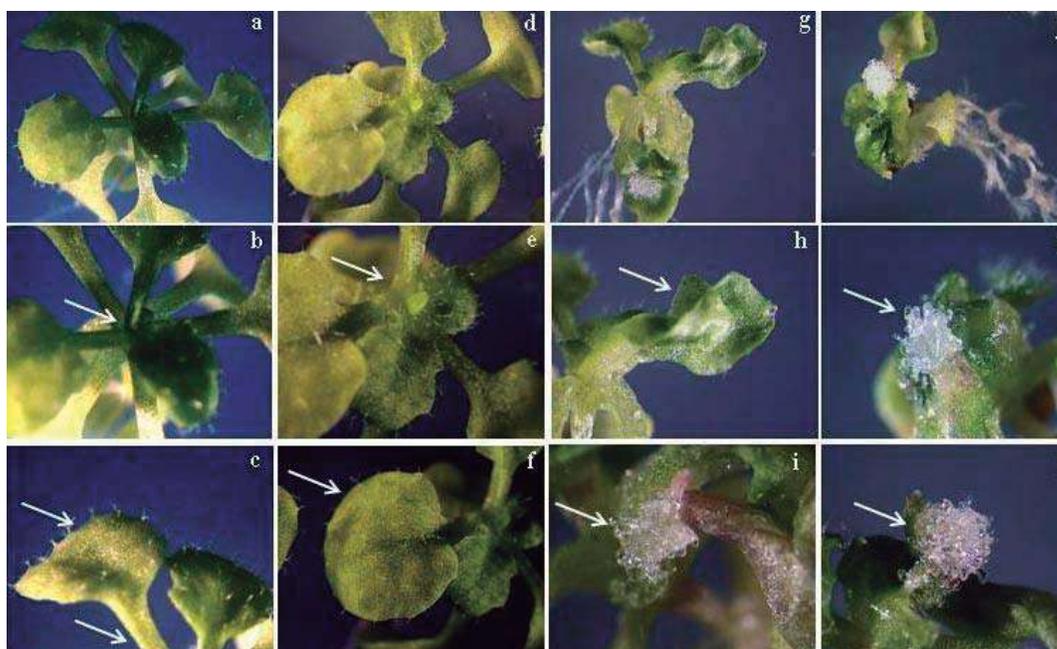


Figura 13. Efecto de la *N*-isobutil decanamida sobre el follaje de *Arabidopsis thaliana* a los 21 días después de la germinación. a-c). Plantas en medio sin *N*-isobutil decanamida. (d-f). Plantas tratadas con 28 μM , (g-h) 56 μM , y (j-l) 112 μM de *N*-isobutil decanamida.

Hasta el momento solo es posible especular sobre el origen e identidad celular de las callosidades de las hojas. Es probable que estas formaciones se deban a una dediferenciación de las células de los tejido para adquirir la capacidad de volver a entrar al ciclo celular para seguirse dividiendo, lo cual se conoce ampliamente en sistemas de cultivo de tejidos *in vitro* como el conocido para la interacción entre auxinas y citocininas (Che *et al.*, 2002).

Es importante mencionar que no está reportado ningún otro tipo de compuesto que tenga este efecto en una planta *in vivo*; las neoplasias solo se semejan a las callosidades provocadas en tejidos *in vitro* por la combinación de auxinas y citocininas. Los efectos de la *N*-isobutil decanamida sobre el follaje sugieren que este compuesto podría modificar directamente el ciclo celular. Aún cuando no se observaron callos en los tratamientos con afinina y capriletanolamida, por las diferencias ya denotadas entre las actividades de las moléculas, no se descarta la posibilidad de que estos últimos sean capaces de inducirlos a concentraciones mayores que la *N*-isobutil decanamida.

9.9. Identificación de marcadores moleculares inducibles por la *N*-isobutil decanamida.

Para estudiar los mecanismos de acción a través de los cuales la *N*-isobutil decanamida regula el desarrollo de las plantas, se realizaron escrutinios en los que se analizaron los cambios de expresión de una amplia variedad de marcadores moleculares representativos de procesos fisiológicos o del desarrollo. Esto se realizó mediante el crecimiento de plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan los promotores de genes de identidad conocida (cuya participación en el desarrollo o las respuestas fisiológicas ya había sido descrita) fusionados a la secuencia codificante de la enzima β -glucuronidasa. El uso de este gen reportero permite visualizar cambios en los patrones de expresión del gen de interés mediante una coloración azul índigo al incubar las plantas con el substrato de la enzima. Después de una revisión bibliográfica se eligieron distintos marcadores para evaluar su expresión bajo tratamientos con *N*-isobutil decanamida y así permitirnos encontrar algún gen regulable por este compuesto. Los genes seleccionados corresponden básicamente a las categorías de: a) marcadores de respuesta a auxinas, b) marcadores de respuesta a citocininas, c) marcadores de ciclo celular y d) marcadores del desarrollo de la raíz y el follaje.

Los resultados de estos experimentos se resumen en la Tabla 4 donde se observa que de todos los marcadores, solo la expresión de los marcadores CycD3::GUS y ARR5::GUS fue modificada con las dos diferentes concentraciones de *N*-isobutil decanamida que fueron 28 y 42 μ M, concentraciones seleccionadas porque estas provocan en la planta diferentes cambios morfológicos los cuales se espera se vean reflejados en el patrón de expresión de estos genes de interés. Todos los marcadores restantes no sufrieron ninguna alteración en su expresión bajo estas condiciones. El gen CycD3 codifica para una ciclina que controla el paso de la fase G1 a S. El gen ARR5 codifica para un factor transcripcional que regula las respuestas a citocininas. Esto nos indica que la *N*-isobutil decanamida tiene blancos específicos a nivel celular y además que probablemente existe una interacción con la ruta de señalización de las citocininas.

Tabla 4. Expresión de los marcadores moleculares con *N*-isobutil decanamida

Marcador	Cambio de expresión en:	
	Follaje	Raíz
DR5::GUS		
BA3::GUS		
ARR1::GUS		
ARR5::GUS	✓	✓
ARR10::GUS		
ARR12::GUS		
CycB1::GUS		
CycD3::GUS	✓	✓
Exo::GUS		
QC46::GUS		
Bop1::GUS		
Bop2::GUS		

En la fig. 14 se muestran fotografías de la expresión basal de ARR5::*GUS* en medio sin *N*-isobutil decanamida, este marcador se encontró que se expresa principalmente en primordios de raíces laterales (Fig. 14 a-b), en una raíz lateral ya formada se expresa en la zona de elongación (Fig. 14 c). También se observa la expresión en el meristemo de la raíz y en la zona de elongación de la misma (Fig. 14 d-e). En el follaje se le encuentra expresándose en el meristemo apical y en la vasculatura principalmente (Fig. 14 f).

En el acercamiento que nos muestra la Fig. 14 g se puede ver como la expresión de ARR5::*GUS* esta localizada en lo que posiblemente sean los núcleos de las células en la región meristemática y de elongación de la raíz, lo cual coincide con el papel de este gen en la ruta de señalización de citocininas y su papel de factor transcripcional el cual ya ha sido ampliamente descrito en la literatura (To *et al.*, 2004).

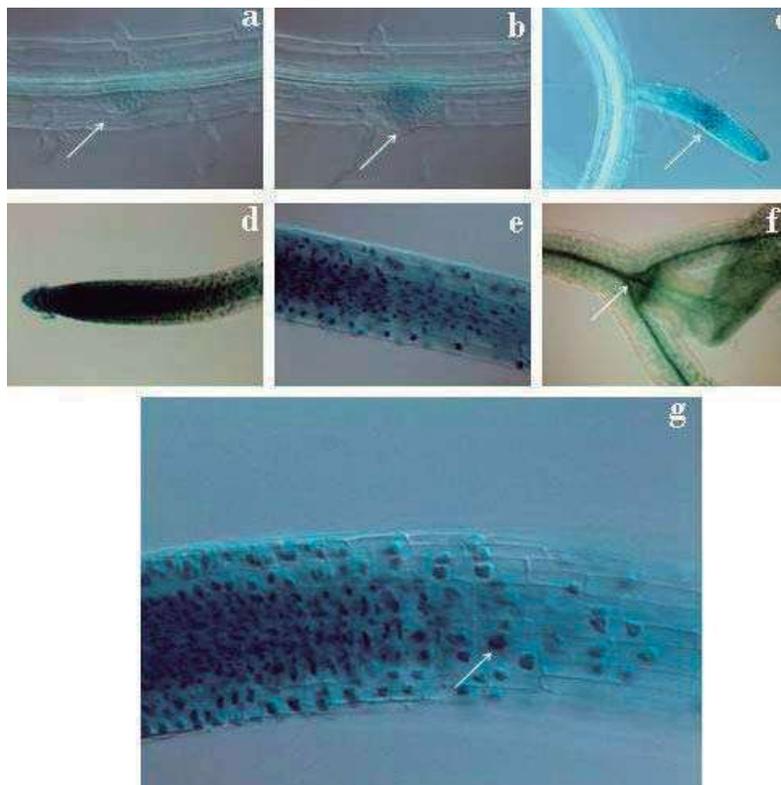


Figura 14. Expresión basal de ARR5::*GUS* en *Arabidopsis thaliana* a los 7 ddg. a, b). Primordios de raíces laterales. C). Raíz lateral en desarrollo. d, e). Zonas meristemática y de elongación de la raíz primaria. f). Follaje. g). Ampliación (40x) de la zona de elongación de la raíz primaria.

Al crecer las plantas transgénicas que contienen el marcador ARR5::GUS con las concentraciones de *N*-isobutil decanamida de 28 y 42 μM , se pudo observar que la expresión de ARR5::GUS está inducida en comparación con las plantas control (Fig. 15). En las plantas control (paneles a-f) podemos apreciar como ARR5::GUS se expresa en los meristemas tanto apical y radicular, en la raíz primaria y en los meristemas de las raíces laterales.

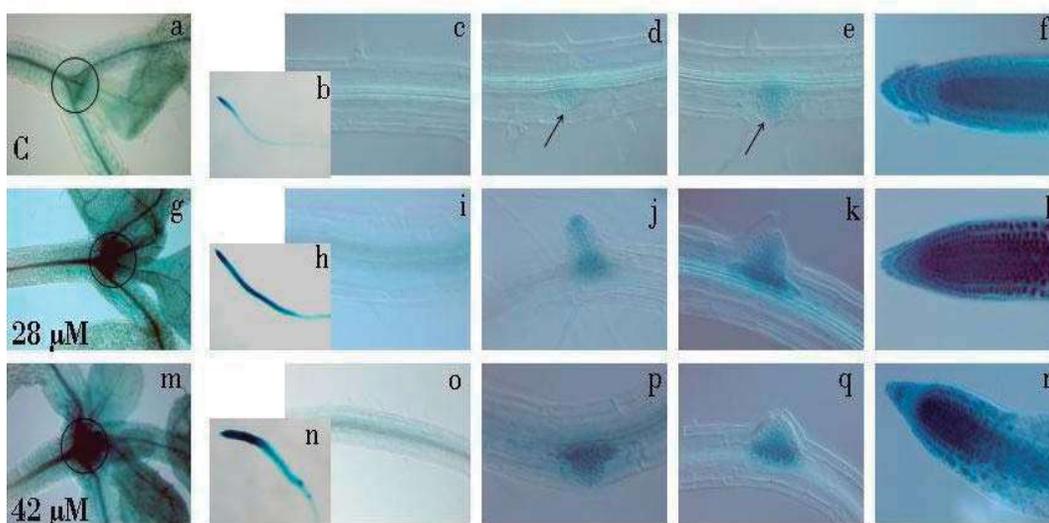


Figura 15. Efecto de la *N*-isobutil decanamida en la expresión de ARR5::GUS . (a-f). Plantas control no tratadas con decanamida. (g-l). Plantas tratadas con 28 μM de decanamida. (m-r). Plantas tratadas con 42 μM de decanamida.

En las plantas tratadas con 28 μM de *N*-isobutil decanamida (Fig. 15 paneles g-l) se aprecia como en el follaje cambia la intensidad de la expresión tanto en el meristemo como en la vasculatura haciéndose mas intenso en ambos sitios en comparación con las no tratadas. De igual forma se observa una expresión ligeramente marcada en el periciclo, que es un tejido adyacente al tejido vascular de la raíz, que no se encuentra en las plantas control y un aumento en la expresión en los primordios de raíces laterales y en el meristemo radicular.

En el caso de las plantas tratadas con 42 μM , se observó una mayor inducción de la expresión del marcador en todos los casos en comparación con el control (Fig. 15 paneles m-r). Esto es debido a que la expresión de ARR5::GUS aumenta por el tratamiento con *N*-isobutil decanamida en todos los tejidos, incluyendo el meristemo apical y la vasculatura del follaje; el periciclo, el meristemo radicular y los primordios de raíces laterales. En el caso del meristemo radicular, se visualiza una zona de expresión menor pero de mayor intensidad en comparación con el control (Fig. 15 paneles m-r). Estos resultados nos indican que la *N*-isobutil decanamida induce la expresión de ARR5::GUS principalmente en zonas con actividad proliferativa como son los meristemos, los primordios de raíces laterales y el periciclo.

Otro marcador inducible por *N*-isobutil decanamida fue CycD3::GUS. Los resultados obtenidos se ilustran en la Fig. 16. Aquí observamos la expresión de este marcador en las raíces laterales en desarrollo y en los meristemos radicular y foliar, así como una expresión difusa en la zona de elongación de la raíz primaria. En la ampliación de la zona de transición entre la zona meristemática y la zona de elongación (Fig. 16 g) se observa como las células más cercanas al meristemo expresan preferentemente este marcador y que la expresión termina en la zona de elongación celular. Esto es consistente con la función biológica que se atribuye al gen CycD3 en la regulación del ciclo celular en los meristemos (Oakenfull *et al.*, 2002).

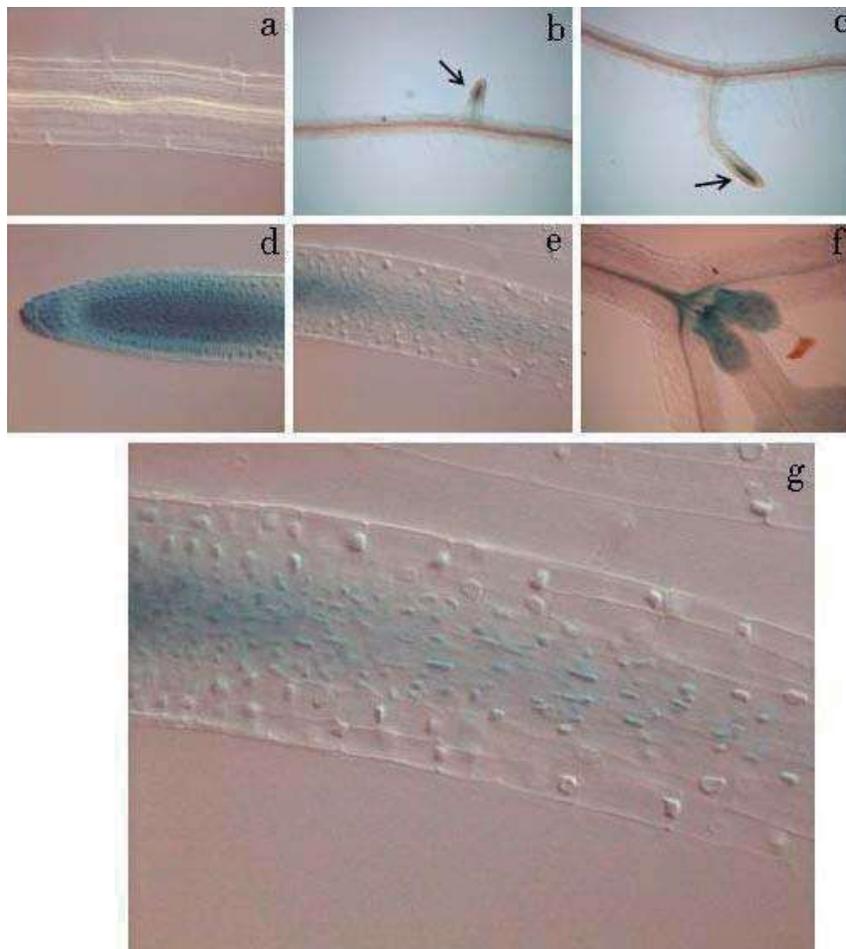


Figura 16. Expresión de CycD3::GUS en *Arabidopsis thaliana*. a) Periciclo. b, c) Meristemos de raíces laterales. d) Meristemo de la raíz primaria. e) Zona de transición entre la zona meristemática y la zona de elongación. f) Follaje. g) Acercamiento de la zona de transición entre la zona meristemática y zona de elongación.

Al crecer las plantas transgénicas que expresan CycD3::GUS con las concentraciones de *N*-isobutil decanamida de 28 y 42 μM , pudimos observar que la expresión de GUS aumenta en diferentes regiones. Los resultados de estos tratamientos se ilustran en la Fig. 17 en donde se aprecia que en las plantas no tratadas (paneles a-d) la expresión preferencial del marcador está en el meristemo radicular. En la concentración de 28 μM de decanamida (paneles e-h) observamos como esta expresión cambia tanto de intensidad como de lugar, ya que se observa como ya no se localiza principalmente en el meristemo radicular, sino que se generaliza en la raíz primaria, incluyendo al periciclo y los primordios de las raíces laterales.

La regulación de CycD3::GUS por *N*-isobutil decanamida es todavía mas evidente en las plantas crecidas en una concentración de 42 μM de este compuesto (paneles i-l) en todos los casos la expresión del marcador se ve claramente aumentada, tanto en el meristemo radicular, a lo largo del periciclo y también en los primordios de raíces laterales.

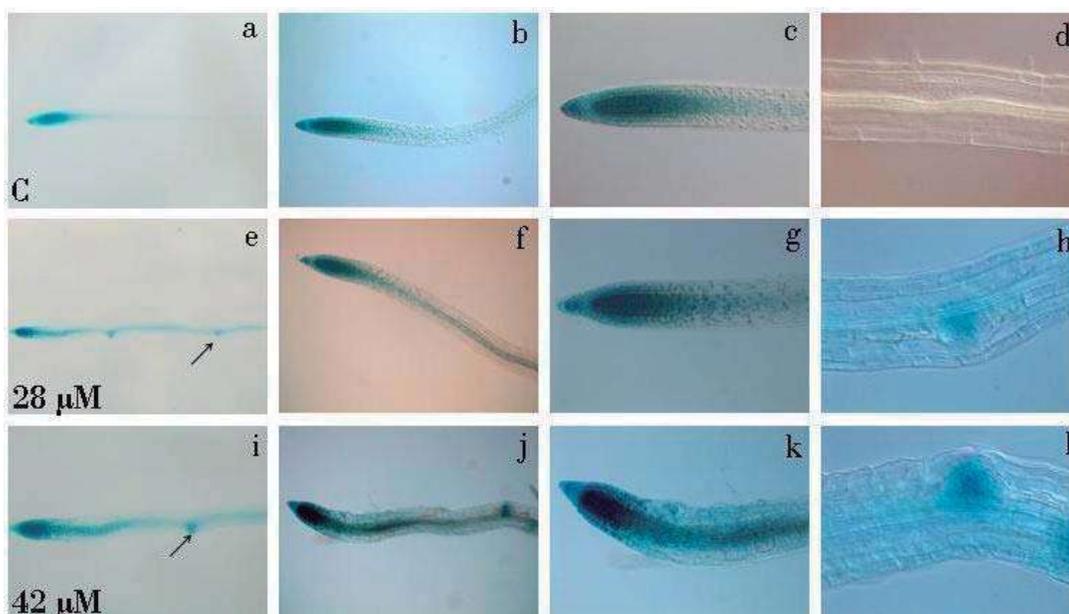


Figura 17. Efecto de la *N*-isobutil decanamida en la expresión de CycD3::GUS.
(a-d). Plantas no tratadas con decanamida. (e-h). Plantas tratadas con 28 μM de decanamida.
(i-l). Plantas tratadas con 42 μM de decanamida.

Los resultados sugieren que la *N*-isobutil decanamida es capaz de inducir la expresión de CycD3::GUS no solo en los sitios normales de su expresión sino también en tejidos donde no se expresa normalmente. Esta actividad biológica podría ser importante para el desarrollo de las plantas y podría explicar los efectos de la alcanamida en la inducción de callos sobre el follaje o en la estimulación de la formación de raíces laterales, un proceso que implica la reactivación del ciclo celular en el periciclo.

Es importante notar que, como ya ha sido descrito previamente por Riou-Khamlichi y col. (1999), la cascada de señalización de las citocininas río abajo de los receptores de membrana estimula la transición del ciclo celular de la fase G1 a S lo cual es posible por la inducción transcripcional del gen *CYCD3* (Riou-Khamlichi et al., 1999). De esta manera se considera que *ARR5* y *CycD3* confluyen en la ruta de señalización de las citocininas y se sugiere una posible interacción entre esta ruta y la posible ruta de señalización de alcaloides y NAEs.

9.10. Efecto de la *N*-isobutil decanamida en la morfogénesis de mutantes afectadas en componentes de la ruta de señalización de auxinas y citocininas.

Como ya se ha mencionado, la combinación de auxinas y citocininas induce la formación de callos en explantes *in vitro*. Con el interés de identificar una posible interacción a nivel genético entre la ruta de señalización de estas hormonas vegetales con la emergente ruta de las alcaloides y NAEs, se evaluaron los efectos de la *N*-isobutil decanamida en el crecimiento de las mutantes afectadas en la señalización por auxinas. Los experimentos incluyeron mutantes afectadas en factores de transcripción como *iaa 28*, *arf 17* y *slr 1* o afectadas en proteínas que regulan el transporte polar de auxinas como *aux 1-7*, *doc 1* y *eir 1*. Para caracterizar la respuesta de las mutantes a la *N*-isobutildecanamida se tomó como marcador de desarrollo el crecimiento de la raíz primaria.

Los resultados obtenidos se presentan en la Fig. 18 en donde se muestra como en las columnas correspondientes al tratamiento sin *N*-isobutil decanamida, las líneas mutantes presentan un crecimiento similar al ecotipo silvestre (Col-0), excepto *doc 1*, *eir 1* y *aux 1-7*, que formaron raíces un poco mas cortas. Cuando las plantas fueron tratadas con 28 μ M de *N*-isobutil decanamida se observa en primer lugar que el crecimiento de todas las mutantes se uniformiza. Al calcular el porcentaje de inhibición de la raíz por el compuesto para cada una de las mutantes con respecto al crecimiento en medio sin *N*-isobutil decanamida, se encontró que los porcentaje de

inhibición son muy similares con los de las plantas silvestres, lo que sugiere que todas las mutantes resistentes a auxinas son igualmente sensibles a los efectos de la *N*-isobutil decanamida. Estos resultados descartan la posibilidad de una interacción entre la ruta de señalización de las auxinas con las alcamidas.

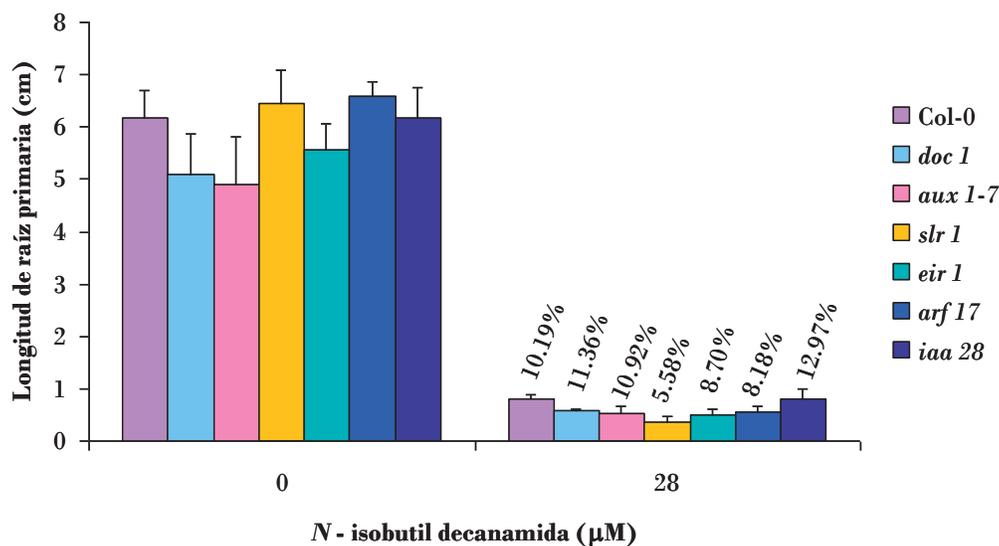


Figura 18. Efecto de la *N*-isobutil decanamida en el crecimiento de la raíz primaria de las mutantes afectadas en componentes de la ruta de señalización de auxinas. Plantas analizadas a los 10 ddg. Los porcentajes representan el crecimiento después del tratamiento con *N*-isobutil decanamida en comparación con el control.

Experimentos similares se realizaron para evaluar el efecto de la *N*-isobutil decanamida en el crecimiento de la raíz primaria en mutantes afectadas en la respuesta a citocininas. Los receptores de citocininas son proteínas tipo histidina cinasa de localización membranal que en *A. thaliana* están codificadas por los genes *cre1*, *ahk2* y *ahk3*. Plantas de las líneas mutantes *cre1*, *ahk2*, *ahk3*, *cre1/ahk2*, *cre1/ahk3*, *ahk2/ahk3*, además de *rpn12* que codifica para una subunidad del proteosoma y que también interviene en la ruta de señalización de citocininas, fueron crecidas en medio sin *N*-isobutil decanamida o con 28 µM del compuesto y la raíz primaria se midió a los 10 d después de la germinación.

Los resultados obtenidos se presentan en la fig. 19. De manera similar al efecto observado con las mutantes resistentes a auxinas, se encontró que el crecimiento sin *N*-isobutil decanamida en algunas de las líneas mutantes está afectado. En el caso de

las plantas tratadas con 28 μM de *N*-isobutil decanamida, la inhibición del crecimiento no presenta diferencias en todas las líneas evaluadas. Estos resultados indican que la interacción potencial en el mecanismo de señalización de las alcamidas y las citocininas para regular el crecimiento de la raíz primaria no ocurre a nivel de los receptores de citocininas.

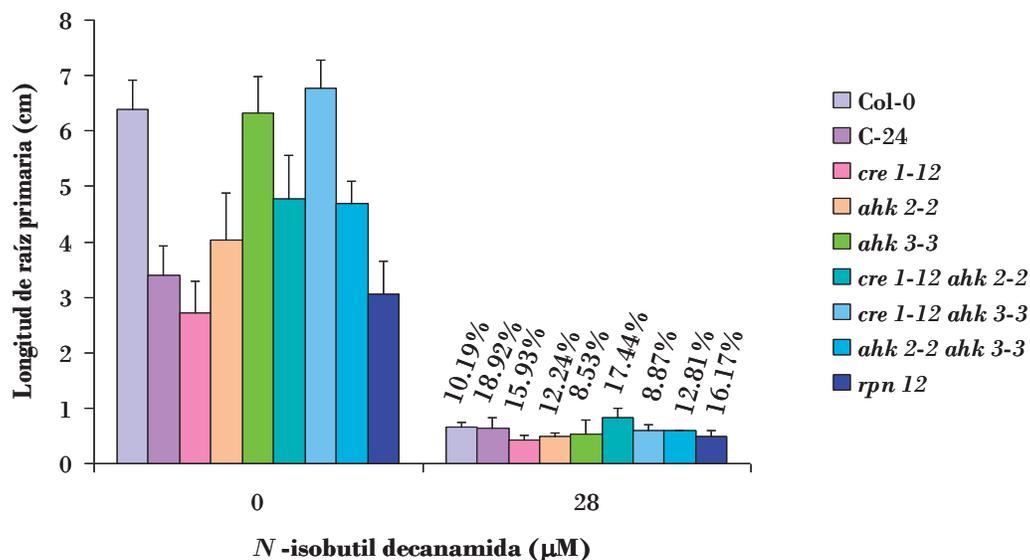


Figura 19. Efecto de la *N*-isobutil decanamida en el crecimiento de la raíz primaria de las mutantes afectadas en componentes de la ruta de señalización de citocininas. Plantas analizadas a los 10 dgd. Los porcentajes representan el crecimiento después del tratamiento con *N*-isobutil decanamida en comparación con el control.

9.11. Aislamiento de mutantes afectadas en las respuestas morfogénicas a la *N*-isobutil decanamida.

Los bioensayos realizados para estudiar la respuesta a la *N*-isobutil decanamida de las mutantes afectadas en la señalización de auxinas y citocininas, indican que probablemente las alcamidas ejercen sus efectos celulares mediante una ruta de señalización distinta. Para identificar algunos genes potencialmente involucrados en la respuesta a alcamidas, se realizó un escrutinio para aislar mutantes resistentes o

hipersensibles a *N*-isobutil decanamida, tomando como marcadores el crecimiento de la raíz primaria y la formación de callos en el follaje.

Con esta finalidad se adquirió semilla de *A. thaliana* mutagenizada con etil metano sulfonato en la casa comercial Lehle seeds (Lehle Seeds, Round Rock TX, USA). De esta población, se sembraron 12, 000 semillas en medio con una concentración de 42 μ M de *N*-isobutil decanamida, en 120 placas conteniendo 100 semillas cada una, las mutaciones representadas equivalen en promedio al número de genes que se encuentran en el genoma de *A. thaliana*. Con este número de semillas sembradas, es posible teóricamente identificar al menos una mutante por gen. A los 14 días se examinaron los fenotipos resultantes buscando fenotipos resistentes, los cuales se identificaron por una mayor elongación de la raíz primaria en comparación con el ecotipo silvestre (Col-0), así como fenotipos hipersensibles, que se identificaron por una menor elongación de la raíz primaria, así como por los efectos de la *N*-isobutil decanamida en la formación de callos en el follaje.

Las mutantes hipersensibles que se aislaron se presentan en la fig. 20. Estas mutantes se caracterizan porque en la concentración de 42 μ M de *N*-isobutil decanamida presentan neoplasias generalizadas en todo el follaje. Es importante hacer notar que este fenotipo es además de muy interesante, muy novedoso, ya que solo se conoce un reporte de mutantes con un fenotipo similar definidas por los genes TSD (*tumorous shoot development, tsd1, tsd2 y tsd 3*) (Frank *et al.*, 2002). Estas mutantes fueron aisladas en un escrutinio similar al realizado en este trabajo, pero evaluando la respuesta a citocininas. Se sugiere que la mutación en los genes TSD regulan negativamente la actividad meristemática dependiente de citocininas durante el desarrollo vegetativo de *Arabidopsis* lo cual produce el fenotipo de neoplasias generalizadas.

De estas tres mutantes aisladas, solo la M4 (Fig. 20, c-d) sobrevivió el transplante a suelo y produjo semilla para el análisis genético de la progenie.

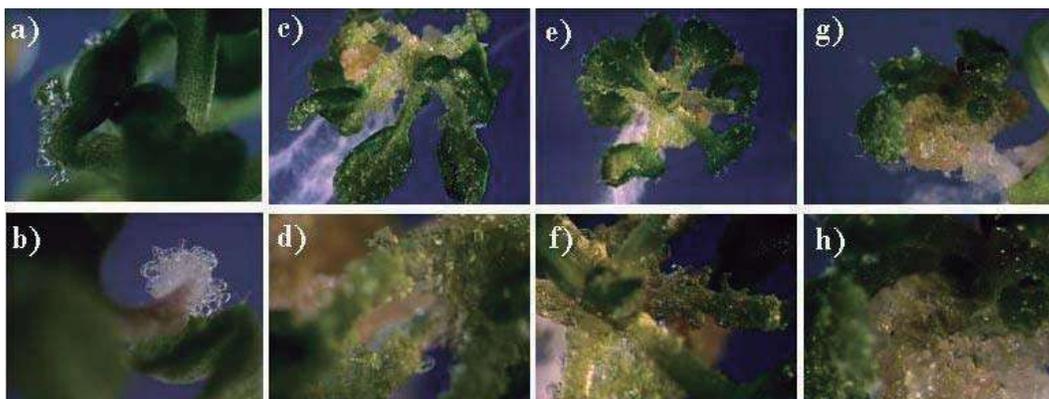


Figura 20. Mutantes hipersensibles a *N*-isobutil decanamida. (a, b). Col-0. (c, d). M4. (e, f). M26. (g, h) M73. Se presentan fotografías de follajes de plantas crecidas en medio con 42 μ M de *N*-isobutil decanamida a los 14 días después de la germinación.

Mediante la estrategia de analizar el crecimiento de la raíz primaria se identificó la mutante M43, la cual es resistente al efecto de la *N*-isobutil decanamida en la inhibición del crecimiento. En la Fig. 21 se observa el crecimiento de 5 plantas silvestres del ecotipo Col-0 (izquierda) creciendo al lado con 5 mutantes M43 (derecha) en un medio con 42 μ M de *N*-isobutil decanamida. En esta concentración las mutantes tienen más larga la raíz primaria y forman menos raíces laterales que las plantas control.



Figura 21. Mutante resistente a *N*-isobutil decanamida crecida en medio con 42 μ M de decanamida. Fotografía tomada a los 12 d.d.g.

La confirmación del fenotipo de resistencia se realizó creciendo plantas en diferentes concentraciones de *N*-isobutil decanamida y los resultados de este experimento se muestran en la Fig. 22. Así podemos observar que en el medio sin *N*-isobutil decanamida, las mutantes crecen mas lentamente que las plantas normales. En las diferentes concentraciones de la alcamida se aprecia una mayor inhibición del crecimiento de la raíz en las plantas normales que las mutantes. Aún en la concentración de 120 μ M en donde las plantas normales están muy afectadas en su crecimiento, las mutantes M43 siguen creciendo y presenta una raíz primaria considerablemente más grande así como un follaje menos alterado.

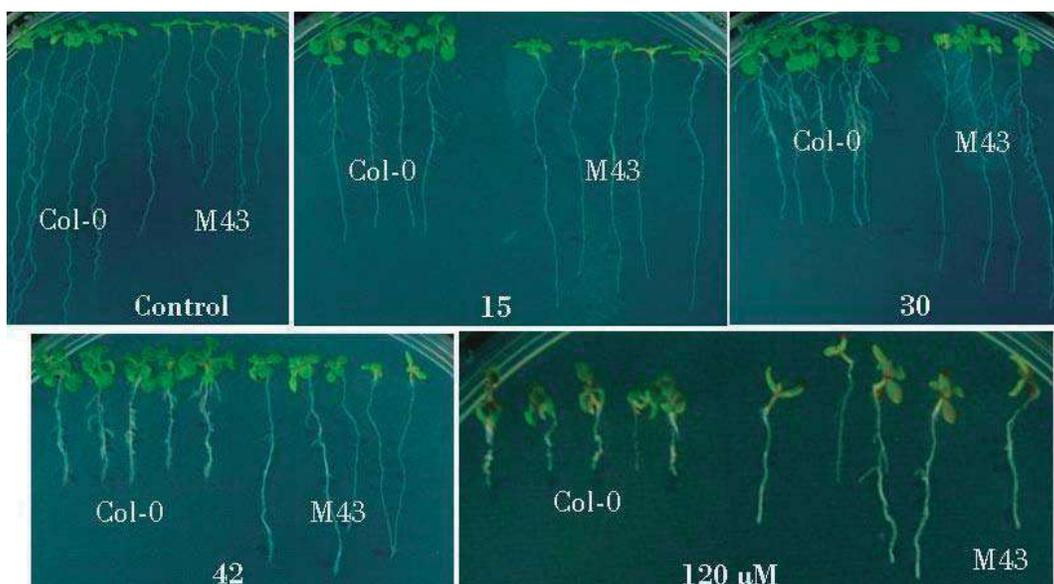


Figura 22. Efecto de la *N*-isobutildecanamida en el crecimiento de plantas silvestres (Col-0) y las mutantes M43. Plantas de 12 días después de la germinación.

El hallazgo de mutantes afectadas en la respuesta a la *N*-isobutil decanamida indica que esta sustancia efectivamente es capaz de regular el crecimiento vegetal mediante una ruta de señalización controlada a nivel genético.

9.12. Modelo para explicar los efectos de la *N*-isobutil decanamida en el desarrollo vegetal.

En base a los resultados obtenidos se plantea un modelo (Fig. 23) para explicar los efectos de la *N*-isobutil decanamida en *A. thaliana*. El modelo descarta la posible participación de las auxinas, en primer lugar por que el AIA y las alcaloides son químicamente distintas. En segundo lugar porque ninguno de los marcadores moleculares de respuesta a auxinas probado fue inducido por la *N*-isobutil decanamida y finalmente por que ninguna de las mutantes afectadas en los genes que participan en la ruta de señalización de las auxinas resultó resistente o hipersensible a la *N*-isobutil decanamida.

Por otra parte, el modelo sugiere una interacción de la *N*-isobutil decanamida con la ruta de señalización de citocininas. En la señalización por citocininas, primero se encuentran los receptores membranales codificados por los genes *cre1-12*, *ahk 2* y *ahk 3*. Río abajo de estos receptores se encuentran los elementos de respuesta a citocininas o ARRs, que codifican para factores de transcripción, uno de estos elementos, ARR5 fue inducido por la *N*-isobutil decanamida. La ruta de citocininas regula el ciclo celular en la fase G1-S mediante el control de la expresión de la ciclina *CycD3*. En nuestros experimentos, una fusión transcripcional entre el promotor del gen *CycD3* y el gen reportero GUS (*CycD3::GUS*), se indujo mediante el tratamiento con *N*-isobutil decanamida, lo que confirma que este compuesto puede regular la proliferación celular mediante el control de la expresión de una ciclina mitótica.

Las mutantes hipersensibles y resistentes a *N*-isobutil decanamida nos indican que este compuesto puede ser importante para el desarrollo de la planta. La caracterización fenotípica y molecular de las mutantes permitirá saber si las alcaloides regulan la morfogénesis vegetal a través de una ruta de señalización específica.

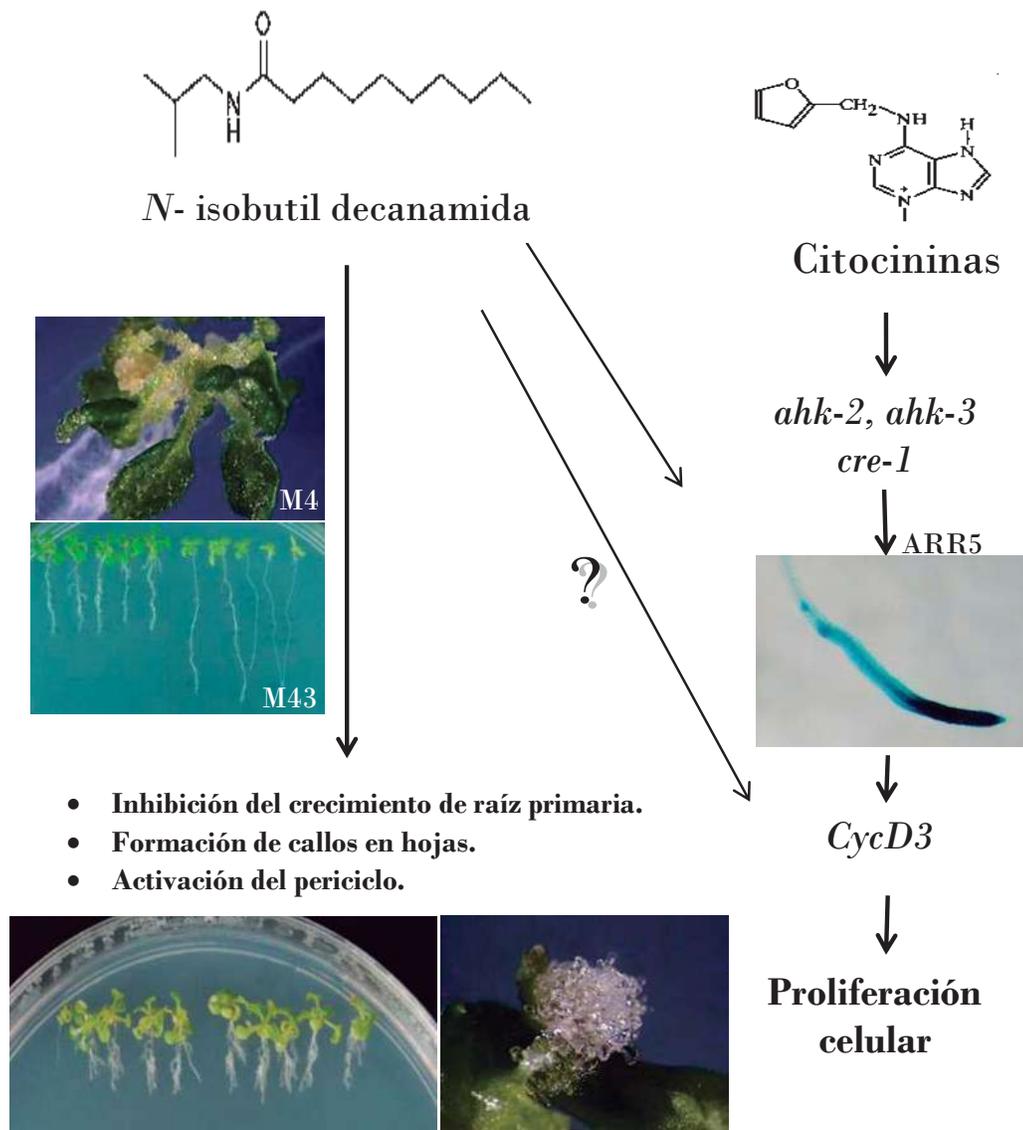


Figura 23. Modelo para explicar la actividad de la *N*-isobutil decanamida en *A. thaliana*.

10. CONCLUSIONES.

Los efectos biológicos que provocan las alcanidas y las *N*-aciletanolamidas en el desarrollo de las plantas indican que estos compuestos forman un nuevo grupo de reguladores del crecimiento vegetal de entre los cuales la *N*-isobutil decanamida es la más activa.

La inducción del marcador pCycD3::GUS indica que la *N*-isobutil decanamida tiene un blanco selectivo y específico a nivel del ciclo celular, ya que es sabido que esta ciclina controla la transición de G1 a S. Esto podría explicar los efectos de la molécula provocando la proliferación de callos en el follaje como las que fueron observadas en las concentraciones de 56 a 112 μ M de *N*-isobutil decanamida.

Las respuestas obtenidas de las mutantes en las rutas de señalización de citocininas y auxinas al no presentar resistencia al efecto de la molécula sugieren que la *N*-isobutil decanamida actúa a través de una ruta novedosa de señalización, que además por la inducción de pARR5::GUS podría converger en algún sitio con la ruta de señalización de las citocininas.

Las mutantes identificadas sugieren que en *A. thaliana* existen mecanismos genéticos que regulan las respuestas del desarrollo vegetal a la acción de la *N*-isobutil decanamida.

11. LITERATURA CITADA.

1. Alger B. E. (2004). Endocannabinoids: Getting the message across. *PNAS*. 101:8512-8513.
2. Berdyshev E. V., Schmid P.C., Krebsbach R. J., Hillard C. J., Huang C., Chen N., Dong Z. y Schmid H.H.O. (2001). Cannabinoid-receptor-independent cell signaling by *N*-acylethanolamines. *Biochem J*. 360:67-75.
3. Berleth T., Krogan N.T. y Scarpella E. (2004). Auxin signals-turning genes on and turning cells around. *Curr. Opin. Plant Biol*. 7:553-563.
4. Blancaflor E.B., Hou G. y Chapman K.D. (2003). Elevated levels of *N*-lauroylethanolamine, an endogenous constituent of desiccated seeds, disrupt normal root development in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Planta*. 217:206-217.
5. Casimiro I., Marchant A., Bhalerao R. P., Beeckman T., Dhooge S., Swarup R., Graham N., Inzé D., Sandberg G., Casero P. J. y Bennett M. (2001) Auxin Transport Promotes *Arabidopsis* Lateral Root Initiation. *Plant Cell*. 13:843-852.
6. Chapman K.D. (2004). Occurrence, metabolism, and prospective functions of *N*-acylethanolamines in plants. *Prog. Lipid Res*. 43:302-327.
7. Che P., Gingerich K. J., Lall S. y Howell S. H. (2002). Global and Hormone-induced gene expression changes during shoot developmente in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 14:2771-2785.

8. Colón-Carmona A., You R., Haimovitch-Gal T. y Doerner P. (1999). Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J.* 20: 503-508.
9. D'Agostino I. B., Deruère J. y Kieber J. J. (2000). Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiol.* 124: 1706-1717.
10. del Pozo J. C. Lopez-Matas M. A., Ramirez-Parra E. y Gutierrez C. (2005). Hormonal control of the plant cell cycle. *Physiologia Plantarum* 123: 173–183.
11. Farrar K., Evans I. M., Topping J. F., Souter M. A., Nielsen J.E., y Lindsey K. (2003). EXORDIUM – a gene expressed in proliferating cells and with a role in meristem function, identified by promoter trapping in *Arabidopsis*. *Plant J.* 33: 61–73.
12. Frank M., Guivarc'h A., Krupkova E., Lorenz-Meyer I., Chriqui D. y Schmuëlling T. (2002). TUMOROUS SHOOT DEVELOPMENT (TSD) genes are required for co-ordinated plant shoot development. *Plant J.* 29: 73-85.
13. Fukaki H., Tamedo S., Masuda H. y Tasaka M. (2002). Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY ROOT/ IAA14 gene of *Arabidopsis*. *Plant J.* 29:153-168
14. García-Chávez A., Ramirez-Chavez E. y Molina-Torres J. (2004). El género *Heliopsis* (Heliantheae; Asteraceae) en México y las alcamidas presentes en sus raíces. *Act. Botnca. Mex.* 69:115-131.
15. Gray W. M. (2004). Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS Biology.* 2:12701273.

-
16. Grotenhermen F. (2006). Los cannabionoides y el sistema endoannabinoide. *Cannabinoids*. 1:10-14.
 17. Higuchi M., Pischke M. S., Mähönen A. P., Miyawaki K., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Shinozaki K., Kato T., Tabata S., Helariutta Y., Sussman M. R. y Kakimoto T. (2004). *In planta* functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *PNAS* 101:8821-8826.
 18. Himanen K., Boucheron E., Vanneste S., de Almerida Angler J., Inzé D. y Beeckman T. (2002). Auxin-Mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell*. 14:2339-2351.
 19. Howell S. H., Lall S., y Che P. (2003) Cytokinins and shoot development. *TRENDS in Plant Sci.* 8:453-459.
 20. Kakimoto T. (2003) Perception and signal transduction of cytokinins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54:605-627.
 21. Kanbe K., Naganawa H., Okamura M., Sasaki T., Hamada M., Okami Y. y Takeuchi T. (1993). Amidenin, a new plant growthregulating substance isolated from *Amycolatopsis* sp. *Biosci Biotechnol. Biochem.* 57:1261-1263.
 22. Kende H. y Zeevaart J. D. A. (1997). The five “classical” plant hormones. *Plant Cell*. 9:1197-1210.
 23. Li H., Altschmied L., y Chory J. (1994). *Arabidopsis* mutants define downstream branches in the phototransduction pathway. *Genes Dev.* 8:339-349.

-
24. Li X., Mo X., Shou H. y Wu P. (2006). Cytokinin-Mediated cell cycling arrest of pericycle founder cells in lateral root initiation of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 47:1112-1123.

 25. Ljung K., Bhalerao R. P. y Sandberg G. (2001). Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J.* 28:465-474.

 26. López-Bucio J., Cruz-Ramírez A. y Herrera-Estrella L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:280-287.

 27. López-Bucio J., Acevedo-Hernandez G., Ramírez-Chávez E., Molina-Torres J. y Herrera-Estrella L. (2006). Novel signals for plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9:523-529.

 28. Malamy J. E. y Benfey P. N. (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124:33-44.

 29. Mason M. G., Li J., Mathews D. E., Kieber J. J. y Schaller G. E. (2004). Type-B response regulators display overlapping expression patterns in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 135:927-937.

 30. Morquecho-Contreras A. y López-Bucio J. (2007). Cannabinoid-like signaling and other new developmental pathways in plants. *Int. J. Plant Dev. Biol.* 1:34-41.

 31. Motes C. M., Pechter P., Min-Yoo C., Yuh-Shuh W., Chapman K.D. y Blancaflor E.B. (2005) Differential effects of two phospholipase D inhibitors, 1-butanol and *N*-acylethanolamine, on *in vivo* cytoskeletal organization and *Arabidopsis* seedling growth. *Protoplasma.* 226:109-123.

-
32. Norberg M., Holmlund M. y Nilsson O. (2005). The BLADE ON PETIOLE genes act redundantly to control the growth and development of lateral organs. *Development*. 132:2203-2213.
33. Oakenfull, E. A., riou-Dhamlichi C. y Murray J. A. H. (2002). Plant D-type cyclins and the control of G1 progression. *Phil. Trans. Soc. Lond.* 357:749-760
34. Oono Y., Chen Q. G. Overvoorde P. J., Höhler C. y Theologis A. (1998). *age* Mutants of *Arabidopsis* exhibit altered auxin-regulated gene expression. *Plant Cell*. 10:1649-1662.
35. Pagnussat G. C., Simontacchi M., Pantarulo S. y Lamattina L. (2002) Nitric Oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol*. 129:954-956.
36. Pickett F.B., Wilson A.K. y Estelle M. (1990). The *aux1* mutation of *Arabidopsis* confers both auxin and ethylene resistance. *Plant Physiol*. 94:1462-1466.
37. Raduner S., Mejewaska A., Chen J-Z., Xie X-Q., Hamon J., Faller B., Altmann K.-H. y Gertsch J. (2006). Alkylamides from *Echinacea* are a new class of cannabinomimetics. *J. Biol. Chem*. 281:14192-14206.
38. Ramírez-Chávez E., López-Bucio J., Herrera-Estrella L. y Molina-Torres J. (2004). Alkamides isolated from plants promote growth and alter root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 134:1058-1068.
39. Rashottel A. M., Chael H. S., Maxwell B. B. y Kieber J. J. (2005). The interaction of cytokinin with other signals. *Physiol. Plant*. 123:184-194.

-
40. Riou-Khamlichi C., Huntley R., Jacquard A. y Murray J.A. (1999). Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science*. 283:1541-1544.
41. Rogg L.E., Lasswell J. y Bartel B., (2001). A gain-of-function mutation in IAA28 suppresses lateral root development. *Plant Cell*. 13:465-480.
42. Roman G., Gubarsky B., Kieber J., Rothenberg J. y Ecker J. R. (1995) Genetic analysis of ethylene signal transduction in *Arabidopsis thaliana*: five novel mutant loci integrated into a stress response pathway. *Genetics*. 139:1393-1409.
43. Sabatini S., Beis D., Wolkenfelt H., Murfett J., Guifoyle T., Malamy J., Benfey P., Leyser O., Bectold N., Weisbeek P. y Scheres B. (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell*. 99: 463-472.
44. Scheres B. y Wolkenfelt H. (1998). The *Arabidopsis* root as a model to study plant development. *Plant Physiol Biochem*. 36:21-32.
45. Smalle J., Kurepa J., Yang P., Babiychuk E., Kushnir S., Durski A., Vierstra R. D. (2002). Cytokinin growth responses in *Arabidopsis* involve the 26S proteasome subunit RPN12. *Plant Cell*. 14:17-32.
46. Skoog F., y Miller C. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol*. 11:118-131.
47. To J.P.C., Haberer G. Ferreira F., Deruere J., Mason M., Schaller E., Alonso J., Ecker J. y Kieber J.J. (2004). Type-A *Arabidopsis* response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell*. 16:658-671.

-
48. Ulmasov T., Murfett J., Hagen G., y Guilfoyle T. J. (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell*, 9:1963-1971.
49. Walch-Liu P., Liu L., Remans T., Tester M. y Forde B.G. (2006). Evidence that L-Glutamate can act as an exogenous signal to modulate root growth and branching in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 47:1045-1057.
50. Wang Y. S., Shrestha R., Kilaru A., Wiant W., Venables B. J., Chapman K. D. y Blancaflor E. B. (2006). Manipulation of *Arabidopsis* fatty acid amide hydrolase expression modifies plant growth and sensitivity to *N*-aciletanolamines. *PNAS*. 32:12197-12202.
51. Weyers J. D. B. y Patterson N.W. (2001). Plant hormones and the control of physiological processes. *New Phytol.* 152:375-407.
52. Woodward A. W. y Bartel B. (2005a). Auxin: Regulation, action and interaction. *Annals Bot.* 95: 707-735.
53. Woodward A. W. y Bartel B. (2005b). A receptor for Auxin. *Plant Cell*, 17:2425-2429.

12. APENDICE.

Lista de abreviaturas para las mutantes utilizadas en este trabajo.

<i>aux 1-7</i>	<i>Auxin/IAA gene family 1</i>	(Pickett <i>et al.</i> , 1990).
<i>iaa 28</i>	<i>Auxin/IAA gene family 28</i>	(Rogg <i>et al.</i> , 2001).
<i>slr 1</i>	<i>Solitary root/IAA 14</i>	(Fukaky <i>et al.</i> , 2002).
<i>doc 1</i>	<i>Dark overexpresion of CAP</i>	(Li <i>et al.</i> , 1994).
<i>eir 1</i>	<i>Etilene resistant</i>	(Roman <i>et al.</i> , 1995).
<i>ahk 2</i>	<i>Arabidopsis HK gene family 2</i>	(Higuchi <i>et al.</i> , 2004).
<i>ahk 3</i>	<i>Arabidopsis HK gene family 3</i>	(Higuchi <i>et al.</i> , 2004).
<i>cre 1</i>	<i>Cytokinin Response 1</i>	(Higuchi <i>et al.</i> , 2004).
<i>rpn 12</i>	<i>Subunit of the Arabidopsis regulatory particle</i>	(Smalle <i>et al.</i> , 2002).