



UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

“Estudio de la participación del gen *YUCCA4* en la regulación del crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis thaliana*”

**Tesis para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en Biología Experimental**

Presenta:

Q.F.B. Aarón Giovanni Munguía Rodríguez

Asesor de tesis: D.C. José López Bucio

Doctor en Ciencias en Biotecnología de Plantas

Co-asesora: D.C. Nayelli Marsch Martínez

Doctora en Ciencias en Biotecnología de Plantas

Morelia, Michoacán, Febrero del 2014



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS**

Dedicatoria

A mi familia, amigos y tutores.

Agradecimientos

A mis padres Ma. Lucía Rodríguez Álvarez y Ramón Munguía Miranda, por haberme dado la vida.

A mi abuela Doña Julia Álvarez, mi segunda madre.

A mi hermana Lorena, mis tíos, tías y primos, gracias por todo su cariño.

Al D.C. José López Bucio por darme la oportunidad, la confianza y el apoyo para trabajar en su laboratorio, además de compartirnos sus enseñanzas humanas y académicas.

A la D.C. Nayelli Marsch Martínez, por recibirme en su laboratorio, brindarme momentos gratos y sus conocimientos.

A los D.C. Elda Beltrán Peña, Lourdes Macías Rodríguez, Eduardo Valencia Cantero y Ernesto García Pineda por acceder amablemente a ser parte de mi comité de evaluación y por sus sugerencias en la revisión de este trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de fisiología del desarrollo vegetal: Alejandro, Alfonso, Amira, Deyanira, Edith, Elizabeth, Enrique, Guadalupe, Hexon, Javier, León, Marina, Ramón, Randy, Salvador y Viridiana. De igual forma a Carlos, Daniela, David, Irepan, Juan Carlos y Yolanda del laboratorio de identidad celular de plantas. Gracias por su apoyo y por los buenos momentos en el laboratorio.

A mis compañeros de maestría Andrés, Claudia, Cristina, Edgar, Edith, Erika, Lorena, Marco, Mario, Melina, Milagros, Omar, Ricardo y Sofía.

A mis amigos, a los dirigentes y los miembros en Estados Unidos del Grupo Indaparapeo A.C., por el apoyo y confianza que se me ha brindado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado en la realización de este trabajo.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección del D.C. José López Bucio y en el Laboratorio de Identidad Celular de Plantas en el CINVESTAV unidad Irapuato bajo la co-asesoría de la D.C. Nayelli Marsch Martínez.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDO	I
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	6
2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio.....	6
2.2. Los reguladores del crecimiento vegetal.....	6
2.3. Las auxinas.....	7
2.4. Vía de señalización de las auxinas.....	9
2.5. El transporte de auxinas.....	11
2.6. Biosíntesis del AIA	12
2.6.1. La ruta de la indol-3-acetamida (IAM).....	15
2.6.2. La ruta de la indol-3-acetaldoxima (IAOx).....	15
2.6.3. La ruta de la triptamina (TAM)	16
2.6.4. La ruta del ácido indol-3-pirúvico (IPA)	16
2.7. Conjugación e inactivación del AIA.....	17
2.8. Los genes <i>YUCCA</i>	18
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS	24
5.1. Objetivo general.....	24
5.2. Objetivos específicos.....	24
6. MATERIALES Y MÉTODOS	25

6.1. Material biológico.....	25
6.2. Compuestos químicos.	25
6.3. Preparación de la semilla.....	25
6.4. Condiciones de crecimiento.....	26
6.5. Variables de crecimiento y análisis de datos.	27
6.6. Cruzas con las líneas reporteras	27
6.7. Análisis de expresión del gen de la β -glucoronidasa (GUS).....	28
6.8. Clarificación de tejidos	28
6.9. Extracción de ADN genómico de <i>Arabidopsis</i>	28
6.10. Amplificación y clonación del gen <i>YUCCA4</i>	29
6.11. Transformación de <i>Escherichia coli</i> por choque térmico.....	29
6.12. PCR de colonia.....	30
6.13. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	30
6.14. Extracción de ADN plasmídico	31
6.15. Análisis de restricción de plásmidos.	32
6.16. Secuenciación	32
6.17. Recombinación	32
6.18. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	33
6.19. Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
6.20. Selección de plantas transformantes de <i>Arabidopsis thaliana</i>	34
7. RESULTADOS	35
7.1. Caracterización de la mutante de <i>Arabidopsis thaliana yucca4 (yuc4)</i> obtenida por " <i>activation tagging</i> "	35
7.2. La mutante <i>yuc4</i> tiene un programa de elongación celular alterado.....	37
7.3. <i>yuc4</i> muestra mayor respuesta a auxinas.	38
7.4. <i>yuc4</i> presenta actividad constante del sistema ubiquitina-proteosoma activado por auxinas.....	39
7.5. El ácido naftiltalámico (NPA) disminuye la elongación del hipocótilo en <i>yuc4</i>	41
7.6. La mutante <i>yuc4</i> no presenta niveles alterados de citocininas.	43
7.7. Amplificación y clonación del gen <i>YUCCA4</i>	46

7.8. Recombinación	48
7.9. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	52
7.10. Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	53
7.11. Comparación fenotípica entre plántulas silvestres y la mutante 35S:YUCCA4.....	55
8. DISCUSIÓN	56
9. CONCLUSIONES.....	65
10. PERSPECTIVAS.....	65
11. LITERATURA CITADA.....	66
12. ANEXO I.....	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Arabidopsis thaliana</i> y estructura química de las auxinas	8
Figura 2. Componentes principales en la percepción y señalización de las auxinas.....	10
Figura 3. Metabolismo del AIA en plantas superiores	14
Figura 4. Identificación de la mutante <i>yucca1</i>	21
Figura 5. Crecimiento de plantas silvestres y la mutante <i>yuc4</i>	36
Figura 6. Longitud de células epidérmicas en plantas silvestres y <i>yuc4</i>	37
Figura 7. Expresión del gen reportero <i>BA3::GUS</i>	39
Figura 8. Expresión del gen reportero <i>HS::AXR3NT-GUS</i>	41
Figura 9. Efecto del NPA sobre la longitud del hipocótilo de plántulas silvestres y de la mutante <i>yuc4</i>	43
Figura 10. Expresión del gen reportero <i>ARR5::GUS</i>	45
Figura 11. Clonación del gen <i>YUCCA4</i> en el vector de clonación pENTR™/D-TOPO®	47
Figura 12. Comprobación de la transformación de <i>Escherichia coli</i> con el vector pENTR™/D-TOPO® clonado con <i>YUC4</i>	48

Figura 13. Recombinación del vector de entrada pENTR™/D-TOPO® con el vector pEarleyGate 100.....	50
Figura 14. Comprobación de la transformación de <i>Escherichia coli</i> con el vector pEarleyGate 100 recombinado.....	51
Figura 15. Comprobación de la transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con el vector pEarleyGate 100 recombinado.....	52
Figura 16. Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	54
Figura 17. Comparación fenotípica entre plántulas de la línea silvestre Ws y la mutante 35S:YUCCA4	55

RESUMEN

Las plantas son organismos que integran diversos estímulos ambientales para controlar su crecimiento y desarrollo, dichos procesos están bajo el control de diferentes sustancias conocidas como fitohormonas o reguladores del crecimiento vegetal cuyos mecanismos de acción se han definido gracias al empleo de *Arabidopsis thaliana* como modelo biológico. Las hormonas vegetales más estudiadas son las auxinas, representadas principalmente por el ácido indol-3-acético (AIA), el cual está implicado en prácticamente todos los procesos de regulación del crecimiento y desarrollo vegetal. La biosíntesis del AIA puede ser a través de dos vías: la triptófano (Trp)-independiente y la Trp-dependiente. En la biosíntesis del AIA Trp-dependiente, se ha postulado la existencia de cuatro rutas distintas, siendo la más importante la que involucra al ácido indol-3-pirúvico (IPA) donde las monooxigenasas dependientes de flavina codificadas por los genes *YUCCA* convierten al IPA en el AIA. Se ha descrito que existen 11 genes *YUCCA* en el genoma de *Arabidopsis*, mutaciones con pérdida de función en uno o varios de estos genes ponen de manifiesto su importancia en la biosíntesis del AIA y la existencia de redundancia funcional. Otra estrategia para estudiar este tipo de genes es a través de métodos de sobreexpresión que producen niveles incrementados de transcrito y/o proteína dando como resultado fenotipos de ganancia de función asociados con dicho cambio. En el presente trabajo se investigó la participación del gen *YUCCA4* en la regulación del crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis* utilizando una mutante generada por una inserción de T-DNA que porta activadores transcripcionales (*activation tagging*) y líneas transgénicas de sobreexpresión. Inicialmente, se caracterizó la mutante *thread/yuc4* generada mediante la técnica de "*activation tagging*", la cual tiene un programa de elongación celular alterado relacionado con una mayor respuesta y/o acumulación de auxinas, lo cual fue evidenciado por una mayor expresión del gen reportero inducible por auxinas *BA3::GUS* y por la actividad constante del sistema ubiquitina-proteosoma que conduce a la degradación del represor transcripcional AXR3/IAA17. Además, se descubrió que el ácido N-

naftiltalámico (NPA) bloquea el transporte de auxinas en el hipocótilo provocando su acortamiento en las plántulas *thread/yuc4* hasta alcanzar una longitud similar a las silvestres, lo que demuestra un transporte incrementado de auxinas en el tallo de la mutante. La posible sobreproducción del AIA no parece repercutir en la respuesta a citocininas al no observarse un cambio en la expresión del gen reportero *ARR5::GUS*.

Por otra parte, para confirmar la participación de *YUCCA4* en el fenotipo de *thread/yuc4*, se generaron plantas *35S:YUCCA4* que expresan la secuencia genómica de este gen bajo el control del promotor fuerte y constitutivo *35S* del virus del mosaico de la coliflor, obteniéndose dos líneas homocigotas con fenotipo *in vitro* idéntico al observado en la línea *thread/yuc4*. En conjunto, los resultados obtenidos indican que la sobreexpresión de *YUCCA4* afecta el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis* alterando la respuesta a auxinas y posiblemente los niveles de esta hormona. Las perspectivas de este trabajo, mediante el análisis detallado de los programas de morfogénesis, biosíntesis de auxinas y expresión de genes inducibles por auxinas en las líneas sobreexpresantes nos permitirá obtener información importante sobre la participación de *YUCCA4* en la homeostasis del AIA y su impacto en el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis*.

Palabras clave: *Arabidopsis*, auxinas, *YUCCA4*.

ABSTRACT

Plants integrate diverse environmental stimuli to control their growth and development. These processes are under the control of substances known as phytohormones or plant growth regulators whose action mechanisms have been investigated using *Arabidopsis thaliana* as a biological model. The most studied plant hormones are the auxins, represented by indole-3-acetic acid (IAA), which is involved in most plant growth and developmental processes. IAA biosynthesis can occur via two pathways: tryptophan (Trp)-independent and Trp-dependent. The existence of four different pathways in the IAA Trp-dependent pathway has been postulated, and among them, the most important is the indole-3-pyruvic acid (IPA) pathway where flavin-dependent monooxygenases encoded by YUCCA genes convert IPA into IAA. The existence of 11 YUCCA genes has been reported in the *Arabidopsis* genome, loss of function mutations affecting one or more YUCCA genes reveal its importance on IAA biosynthesis and functional redundancy. However, this redundancy limits our understanding of the precise function of these proteins *in planta*. Another strategy for studying redundant genes is through gain of function studies using plants that express gene constructs aimed at increasing the expression of endogenous genes such as activation tagging or by expressing selected genes under control of strong and constitutive promoters. In this research, the participation of YUCCA4 gene in regulating growth and development of *Arabidopsis thaliana* was investigated using *thread/yuc4*, an activation tagging mutant likely overexpressing YUCCA4 and transgenic lines that overexpress this gene. It was found that *thread/yuc4* mutant generated by activation tagging shows an altered cell elongation program associated with an increased auxin response or biosynthesis, evidenced by higher expression of the auxin-inducible BA3::GUS reporter gene and the constant activity of ubiquitin-proteasome system activated by auxins that induce degradation of the transcriptional repressor AXR3/IAA17. It was further discovered that naphthylthalamic acid (NPA) blocks auxin transport in hypocotyls causing cell shortening in *thread/yuc4* and reaching a similar length to that of wild-type

plants without NPA, demonstrating an increased auxin transport in the stem of *thread/yuc4* plants. Moreover, the possible overproduction of IAA does not seem to affect the response to cytokinins as no change in expression of *ARR5::GUS* reporter gene was evidenced in the mutant as compared to WT plants.

To confirm the *YUCCA4* role on the *thread/yuc4* phenotype, plants expressing *35S:YUCCA4* construct were generated. Two homozygous transgenic lines showed a phenotype similar to *thread/yuc4* plants when grown *in vitro*. Taken together, our results indicate that overexpression of *YUCCA4* affects growth and development of *Arabidopsis thaliana* by altering auxin biosynthesis and/or response. A further analysis of developmental alterations, auxin biosynthesis and auxin-inducible gene expression in the transgenic lines obtained will provide more reliable information about the importance of *YUCCA4* in *Arabidopsis* growth and development, which are perspectives of this work.

Key words: *Arabidopsis*, auxins, *YUCCA4*.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos eucariontes, multicelulares, con gran capacidad adaptativa y los productores primarios de los ecosistemas terrestres al poder llevar a cabo la fotosíntesis. El desarrollo de las plantas está regulado por factores fisiológicos y señales ambientales que desencadenan la producción de compuestos de diferente identidad química para regular un gran número de funciones celulares. Estas sustancias son denominadas hormonas vegetales o reguladores del crecimiento y ejercen sus funciones mediante programas de señalización intracelular específicos que conducen al encendido o apagado de genes. Todos estos compuestos son requeridos para la viabilidad celular, participan en procesos específicos del desarrollo y como integradores de señales ambientales. Las funciones que ejercen cada uno de los reguladores de crecimiento han sido elucidadas mediante su aplicación exógena en diferentes sistemas vegetales o manipulando la expresión de genes que participan en la respuesta a los diferentes fitoreguladores en plantas mutantes y/o transgénicas (Weyers y Paterson, 2001).

Los reguladores del crecimiento vegetal denominados auxinas, representados principalmente por el AIA, fueron los primeros descubiertos debido a que están implicadas en prácticamente todos los procesos del crecimiento y desarrollo vegetal. Para la biosíntesis del AIA en plantas se han propuesto dos vías: la vía triptófano (Trp)-independiente y la Trp-dependiente. Para la biosíntesis del AIA dependiente de Trp se ha postulado la existencia de cuatro rutas distintas. A pesar de que diferentes especies de plantas pueden presentar estrategias únicas y realizar modificaciones para optimizar sus rutas metabólicas, se esperaría que las plantas compartiesen mecanismos centrales conservados evolutivamente en la biosíntesis del AIA, debido a que es una molécula fundamental para su ciclo de vida. No obstante su importancia, la biosíntesis y homeostasis del AIA en angiospermas continúa sin dilucidarse completamente.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio

Arabidopsis thaliana es un excelente modelo para el estudio de los procesos fisiológicos y moleculares de las plantas, ya que es una angiosperma que pertenece a la familia *Brassicaceae* donde se incluyen plantas de importancia agronómica como la coliflor (*Brassica oleracea*) y la canola (*Brassica napus*). *A. thaliana* es una planta de tamaño pequeño (30 cm) y un ciclo corto de vida (6-8 semanas), produce gran cantidad de semilla, se puede cultivar en un espacio reducido y es fácil de manipular en el laboratorio (Fig. 1). Cuenta con un genoma nuclear pequeño secuenciado y publicado distribuido en 5 cromosomas con cerca de 25 500 genes, lo que facilita su manipulación genética, aunado a la existencia de métodos de transformación bien establecidos. Todo ello ha derivado en que la mayoría de los estudios que involucran los mecanismos genéticos, evolutivos, bioquímicos y moleculares que controlan el desarrollo de las plantas, se hayan realizado utilizando a *A. thaliana* (Meyerowitz y Pruitt, 1985; Meinke *et al.*, 1998).

2.2. Los reguladores del crecimiento vegetal

Debido a su estilo de vida sésil, las plantas fueron capaces de desarrollar un sistema sofisticado para integrar información del ambiente y responder activamente a los estímulos bióticos y abióticos, así como generar mecanismos de comunicación entre los diferentes órganos y tejidos, todo esto a través de la síntesis de los diferentes reguladores del crecimiento vegetal. Estos últimos compuestos son producidos por diferentes vías metabólicas y ejercen sus funciones mediante programas de señalización intracelular específicas que conducen, en la mayoría de los casos, a la activación o represión de genes. Un solo regulador puede afectar una amplia gama de procesos, y por otro lado, un solo proceso puede estar controlado al mismo tiempo por múltiples reguladores de crecimiento (Gray, 2004) a concentraciones nanomolares o micromolares (Weyers y Paterson, 2001). Los

reguladores clásicos del crecimiento identificados desde la primera mitad del siglo XX fueron las auxinas, las citocininas, las giberelinas, el ácido abscísico y el etileno, sin embargo, cada vez más compuestos han sido adicionados a esta lista, incluyendo a los brasinoesteroides, al ácido salicílico, las estrigolactonas, el óxido nítrico y los jasmonatos (Santner y Estelle, 2009).

2.3. Las auxinas

Las auxinas son los reguladores del crecimiento vegetal más estudiados, cuyo nombre deriva de la palabra griega “*auxein*” que significa crecer. Se ha determinado que estas fitohormonas están implicadas en la división, elongación y diferenciación celular, repercutiendo en cada aspecto del crecimiento y desarrollo de la planta. Las auxinas participan en la embriogénesis, al regular la polaridad basal-apical en el embrión y en el establecimiento de los meristemas de la raíz y el follaje, así como en la modulación de las respuestas a la luz y gravedad, la arquitectura general de la raíz y follaje, la organogénesis, el desarrollo vascular y el crecimiento de explantes en cultivo de tejidos (Teale *et al.*, 2006).

El estudio de las auxinas es uno de los campos más antiguos de experimentación dentro de la investigación en plantas: los primeros reportes de su función se remontan hasta 1872, cuando Theophil Ciesielski postuló la presencia de una “influencia transmitida” presente en la punta de las raíces de plantas y responsable del gravitropismo (Ciesielski, 1872). Más tarde, Charles y Francis Darwin mostraron que esta “influencia transmitida” modulaba el alargamiento del brote de la planta que le permite un crecimiento trófico hacia la luz (Darwin y Darwin, 1881). El término auxina se le otorgó al investigar sobre sustancias moduladoras del crecimiento vegetal en la orina humana, denominándolas auxinas A y B (Kögl y Smit, 1931). Posteriormente, un compuesto aislado de hongos, estructuralmente distinto pero con actividad auxínica fue llamado heteroauxina, más tarde se determinó su naturaleza química, la cual correspondió al AIA. El AIA es la principal auxina encontrada en la naturaleza, presente además de los hongos, en algas, animales y

principalmente en las plantas (Weissbach *et al.*, 1959). Se han descrito varias moléculas con actividad auxínica en plantas y algunas otras han sido sintetizadas artificialmente (Fig. 1).

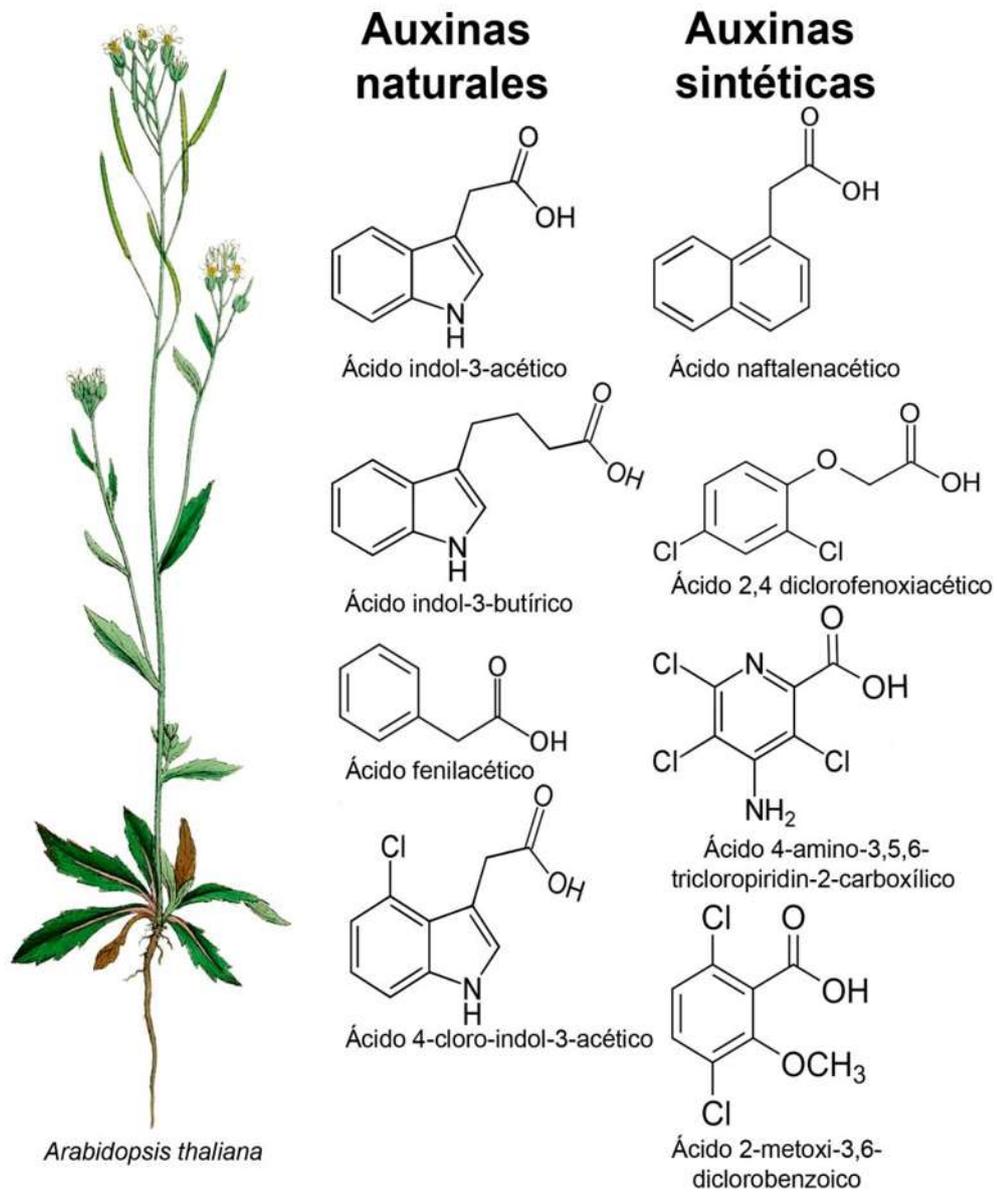


Figura 1. *Arabidopsis thaliana* y estructura química de las auxinas. Esquema de morfología general de *Arabidopsis thaliana* y estructura química de las principales moléculas con actividad auxínica de origen natural y sintético (Modificado de Bowman, 1994).

2.4. Vía de señalización de las auxinas

Un adelanto importante en el entendimiento de la señalización por auxinas, fue el descubrimiento de la familia de receptores de auxinas TIR1/AFB, las cuales son proteínas F-box que junto con otras como ASK1, CUL1, RBX forman el complejo de ubiquitina ligasa SCF^{TIR1}. El AIA se une a TIR1/AFB y a las proteínas AUX/IAA, estas últimas son represores transcripcionales que regulan negativamente la señalización de las auxinas. A niveles bajos de AIA, las proteínas AUX/IAA junto con el co-represor TPL se encuentran unidas a los factores de respuesta a auxinas (ARFs), un grupo de factores transcripcionales que regulan los genes de respuesta temprana a las auxinas (Szemenyei *et al.*, 2008). Los ARFs se unen a elementos de respuesta a auxinas (AREs) localizados en los promotores de los genes de respuesta primaria, para activar su transcripción (Guilfoyle y Hagen, 2007). Cuando existen niveles intracelulares elevados de AIA, ésta se une al receptor y funciona como un “pegamento molecular” entre los represores Aux/IAA y el complejo SCF^{TIR1}, el cual cataliza entonces la ubiquitinación de los Aux/IAA para ser reconocidos y degradados por el proteosoma 26S (Mockaitis y Estelle, 2008). Este último proceso permite la liberación de los ARFs, dando como resultado la transcripción de genes que regulan el desarrollo de la planta en respuesta a auxinas (Benjamins y Scheres, 2008). El gran número de Aux/IAAs y ARFs (29 y 23 en *A. thaliana* respectivamente) indica que la respuesta a auxinas es muy compleja y depende de los niveles endógenos y la especificidad de unión entre las interacciones TIR1-Aux/IAA y Aux/IAA-ARF (Calderón-Villalobos *et al.*, 2012) (Fig. 2).

Una vía de señalización auxínica alternativa, independiente del proteosoma, es a través del receptor putativo de auxinas (AUXIN BINDING PROTEIN 1) ABP1, que está localizado en el retículo endoplásmico y en la membrana celular; se ha sugerido que juega un papel importante durante la división y elongación celular ya que se le involucra en el ablandamiento de la pared, la regulación de la endocitosis y el rearrreglo del citoesqueleto durante la

expansión celular por medio de un mecanismo independiente a la transcripción (Sauer y Kleine-Vehn, 2011) (Fig. 2).

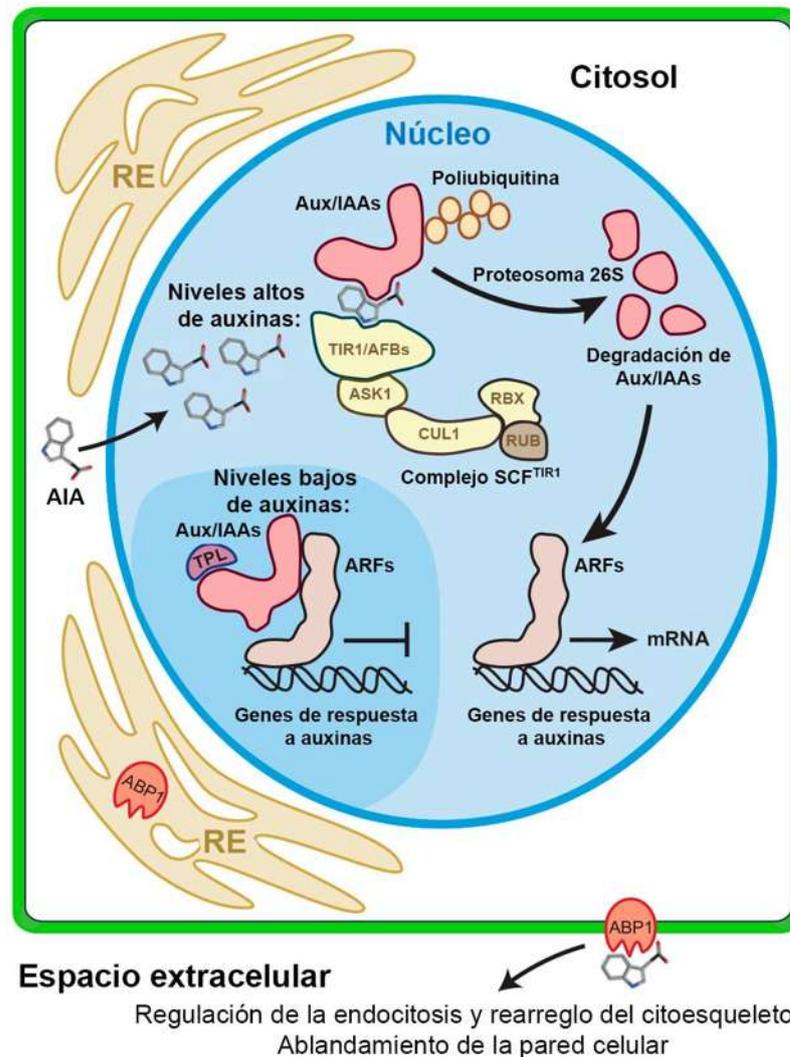


Figura 2. Componentes principales en la percepción y señalización de las auxinas. La unión del AIA al receptor TIR1/AFBs se lleva a cabo en el núcleo. Cuando los niveles de AIA son bajos (fondo azul más oscuro), los Aux/IAAs forman heterodímeros con los ARFs reprimiendo la transcripción. Sin embargo, a niveles altos de AIA (fondo azul más claro), la unión del AIA al receptor provoca su marcaje y degradación por el proteosoma 26S, liberando los ARFs y permitiendo así la expresión de genes de respuesta a auxinas. Las proteínas ABP1, localizadas en el retículo endoplásmico (RE) o en la membrana celular, funcionan también como receptores de AIA, mediando respuestas rápidas a auxinas como la regulación de la endocitosis, el re-arreglo del citoesqueleto y el ablandamiento de la membrana que permite la expansión celular (Modificado de Ljung, 2013).

2.5. El transporte de auxinas

El AIA es un ácido orgánico débil cuya estructura consiste en un anillo indólico unido a una cadena lateral que contiene un grupo carboxilo terminal (Fig. 1). El grupo carboxilo es protonado a pH bajo, haciendo a la molécula menos polar ($\text{AIA}^- + \text{H}^+ = \text{AIA-H}$), forma en la que puede difundir a través de la membrana celular, mientras que la molécula no protonada cargada negativamente (AIA^-) es muy polar y no puede difundir. El pH varía en diferentes compartimentos celulares, de 5.0 a 5.5 en el fluido apoplástico de la pared celular y vacuolas y alrededor de 7.0 en el citosol. El AIA-H en el apoplasto y las vacuolas puede difundir a través de las membranas cercanas, mientras que el AIA^- permanece atrapado dentro de la célula y no puede salir del citosol sin la ayuda de transportadores específicos conocidos como acarreadores de eflujo (Ljung, 2013).

Dos familias proteicas de acarreadores de eflujo para auxinas han sido identificadas en *Arabidopsis*: las PIN y ABCB. También existen proteínas acarreadoras de influjo, como las AUX/LAX, las cuales son importantes para el incremento de los niveles de AIA dentro de células específicas. Recientemente, un nuevo grupo de proteínas transportadoras llamadas PIN-LIKES (PILS) fue identificado, su función se postuló como transportador del AIA entre el citosol y el retículo endoplásmico (Barbez *et al.*, 2012). La localización de los acarreadores de eflujo e influjo en la membrana celular dirige el transporte del AIA dentro y fuera de la célula (también llamado transporte polar de auxinas), permitiendo a la planta contar con un transporte de esta importante hormona entre diferentes células y tejidos (Ljung, 2013). Los genes PIN codifican para proteínas con 10 dominios transmembranales que muestran una localización asimétrica a través de la membrana plasmática consistente con el papel de controlar la polaridad en el movimiento de auxinas, función que se ve afectada por la acción de los inhibidores del transporte de auxinas tales como el ácido triyodobenzoico (TIBA) y el ácido N-naftiltalámico (NPA) (Thomson *et al.*, 1973).

2.6. Biosíntesis del AIA

Las plántulas de *A. thaliana* pueden llevar a cabo la biosíntesis del AIA principalmente en hojas, cotiledones y raíces; siendo las hojas jóvenes las que poseen la mayor capacidad de biosíntesis (Ljung *et al.*, 2001). Se cree que el AIA es sintetizado principalmente a partir de precursores generados en la ruta del ácido shikímico (Fig. 3). Esta vía localizada en los plástidos produce precursores para la biosíntesis de diferentes compuestos indólicos, aminoácidos aromáticos (L-Trp, fenilalanina y tirosina), además de alcaloides, ligninas y flavonoides. El precursor del AIA es el L-Trp que principalmente es utilizado en la biosíntesis de proteínas, debido a ello la cantidad de Trp en el citosol es mayor comparada con la de AIA, sugiriendo una regulación estricta de los pasos intermedios en la biosíntesis del AIA para evitar su sobreproducción (Sairanen *et al.*, 2012).

Se sabe que las rutas de biosíntesis del AIA dependientes de L-Trp son las principales fuentes de auxinas libres, así como de sus precursores y conjugados en plantas. Sin embargo, existen evidencias de la existencia de una ruta de biosíntesis independiente de Trp proveniente del precursor indol-3-glicerol fosfato (IGP) (Ouyang *et al.*, 2000) (Fig. 3). Los genes y enzimas involucrados en la ruta independiente de Trp aún no se conocen por completo y el conocimiento sobre la existencia de esta ruta se basa principalmente en el uso de precursores radiomarcados y mutantes en la biosíntesis de L-Trp. Estudios de este tipo, realizados en una gran variedad de especies de plantas, han demostrado la utilización diferencial de las vías de síntesis Trp-dependiente y Trp-independiente en momentos críticos del desarrollo de la planta incluyendo la embriogénesis (Ribnicky *et al.*, 2002), la maduración del fruto (Epstein *et al.* 2002), en respuestas a cambios de temperatura (Rapparini *et al.*, 2002), durante la germinación y el crecimiento temprano de las plántulas (Ljung *et al.*, 2001) y posteriormente en respuesta a heridas (Sztein *et al.*, 2002).

Las vías de biosíntesis del AIA propuestas en plantas no han sido completamente dilucidadas, escasamente se conocen las bases genéticas de las enzimas clave involucradas y aún no está claro si las vías se encuentran en todas las especies vegetales (Ljung, 2013). También existe una redundancia funcional considerable en varios de los genes de las familias involucradas en la biosíntesis del AIA, lo que requiere mayor investigación para entender la función de cada uno de los genes. Sin embargo, se han realizado avances considerables en cuanto a la identificación de las rutas de biosíntesis del AIA en plantas y los genes involucrados en ellas. Ejemplo de ello, son las rutas de biosíntesis L-Trp dependientes que operan en angiospermas que fueron nombradas de acuerdo al primer metabolito formado a partir del L-Trp (Ljung, 2013) (Fig.3).

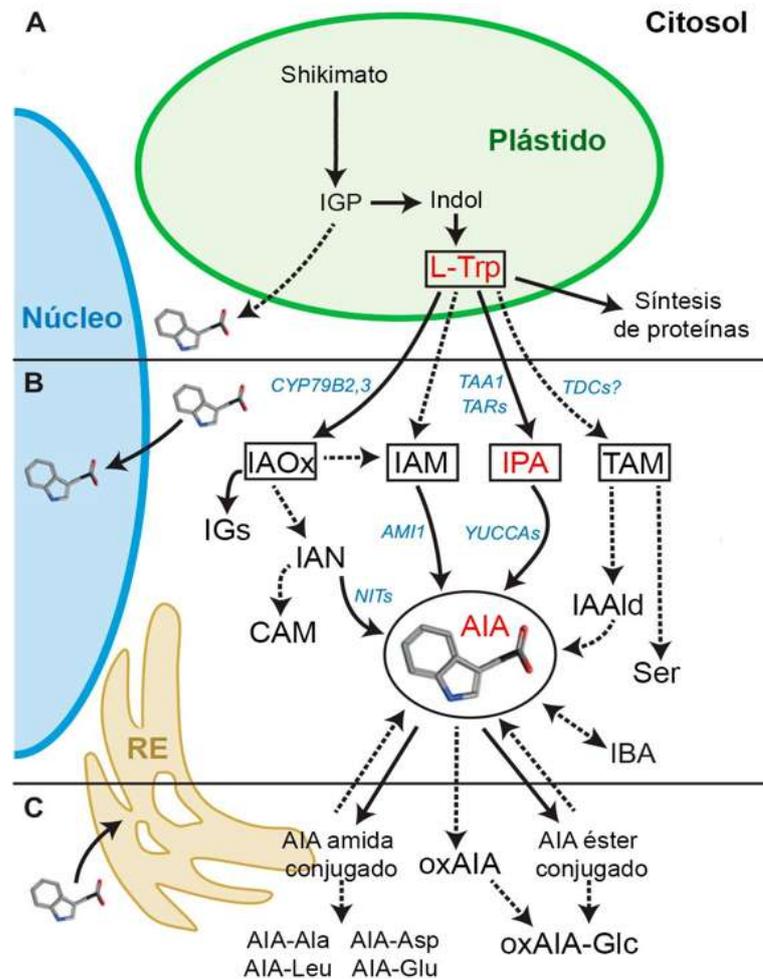


Figura 3. Metabolismo del AIA en plantas superiores. (A) La biosíntesis de los precursores del AIA como el IGP y el L-Trp se lleva a cabo en los plástidos, el L-Trp, principal precursor del AIA es generado por la vía del shikimato. (B) Las subsecuentes rutas de biosíntesis del AIA dependiente de Trp se llevan a cabo en el citosol. Se muestran las cuatro vías putativas de biosíntesis del AIA en plantas superiores: IAOx, IAM, IPA y TAM. Las enzimas cuya función se conoce se muestran en azul. (C) Rutas de degradación y conjugación del AIA. El AIA puede ser conjugado a aminoácidos y azúcares o catabolizado para formar oxAIA. Las flechas continuas indican rutas donde las enzimas, genes o intermediarios son conocidos y las discontinuas indican rutas menos definidas. IGP, indol-3-glicerol fosfato; L-Trp, L-triptófano; IAOx, indol-3-acetaldoxima; IAM, indol-3-acetamida; IPA, ácido indol-3-pirúvico; TAM, triptamina; IGs, indol glucosinolatos; IAN, indol acetonitrilo; CAM, camalexina; IAAld, indol acetaldehído; Ser, serotonina; IBA, ácido indol-3-butírico; oxAIA, ácido 2-oxoindol-3-acético; oxAIA-Glc, ácido 2-oxoindol-3-acético conjugado a glucosa; AIA-Ala, AIA-Leu, AIA-Asp, AIA-Glu, ácido indol-3-acético conjugado a alanina, leucina, aspartato y glutamato, respectivamente (Modificado de Ljung, 2013).

2.6.1. La ruta de la indol-3-acetamida (IAM).

Esta ruta ha sido bien estudiada en bacterias, debido a que más del 80% de las bacterias aisladas de la rizósfera son capaces de sintetizar AIA (Spaepen y Vanderleyden, 2010). En procariotas, el Trp es convertido a la IAM por acción de la triptófano-2-monooxygenasa (iaaM), para ser subsecuentemente hidrolizada a AIA por la IAM hidrolasa (iaaH). De manera similar, en plantas se reporta la existencia de enzimas tipo iaaM, las AMI1 que son capaces de transformar la IAM en el AIA (Fig. 3). La IAM se ha identificado como un compuesto endógeno en *Arabidopsis*, arroz, maíz, tabaco y se cree que está bien distribuida en el reino vegetal (Lehmann *et al.*, 2010). Los genes *iaaM/iaaH* de *Agrobacterium tumefaciens* se han utilizado para generar plantas transgénicas que sobreproduzcan AIA en diferentes especies (Sugawara *et al.*, 2009).

2.6.2. La ruta de la indol-3-acetaldoxima (IAOx).

La IAOx se sintetiza a partir del Trp por la acción de dos enzimas homólogas al citocromo P450 CYP79B2 y CYP79B3. Análisis filogenéticos muestran que la familia de proteínas CYP79B se limita sólo a las especies del orden de las Brassicales indicando que la ruta de biosíntesis del AIA dependiente de la IAOx no es común en las plantas (de Vos *et al.*, 2008). Por otra parte, la IAOx es conocida por ser un intermedio en la síntesis de metabolitos secundarios de las plantas, tales como indol glucosinolatos (IGs), camalexina (CAM) e indol-3-acetonitrilo (IAN) en especies del orden Brassicales incluyendo *Arabidopsis* (Mikkelsen *et al.*, 2009) (Fig. 3).

El IAN ha sido propuesto como un intermedio en la biosíntesis del AIA. Se ha demostrado que las plantas convierten el IAN a AIA por medio de nitrilasas (NITs) (Nafisi *et al.*, 2007), sin embargo, en *Arabidopsis* estas enzimas tienen mayor afinidad por otras moléculas nitriladas (Vorwerk *et al.*, 2001), además, la hidrólisis del IAN por estas enzimas *in vitro* es ineficiente, por lo tanto los

mecanismos exactos por los cuales se convierte IAOx en AIA continúan sin esclarecerse por completo.

2.6.3. La ruta de la triptamina (TAM)

Las triptófano descarboxilasas (TDCs) son enzimas citosólicas ampliamente distribuidas en el reino vegetal (Mano y Nemoto, 2012), que convierten el Trp en TAM, el cual se ha reportado como compuesto endógeno en tomate, arroz, trigo, chícharo y *Arabidopsis* (Tivendale *et al.*, 2013). Originalmente se presumía que la TAM era convertida a N-hidroxitriptamina (NHT) por acción de los genes *YUCCA*, pero esto ha sido motivo de controversia últimamente (Tivendale *et al.*, 2010; Ross *et al.*, 2011). Es posible que la TAM funcione como precursor del AIA por medio del indol-3-acetaldehído (IAAld), además de alcaloides indólicos (Di Fiore *et al.*, 2002) y serotonina (5-hidroxitriptamina) un neurotransmisor en mamíferos y molécula ampliamente distribuida en diferentes especies de plantas que probablemente actúa como inhibidor natural de las auxinas (Pelagio-Flores *et al.*, 2011).

2.6.4 La ruta del ácido indol-3-pirúvico (IPA).

En esta ruta, la triptófano amino transferasa TAA1 y sus homólogos cercanos TAR1 y TAR2 convierten al L-Trp al IPA (Stepanova *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2011) y las enzimas *YUCCA* (YUC) subsecuentemente sintetizan el AIA a partir del IPA (Stepanova *et al.*, 2011; Won *et al.*, 2011). Hasta hace pocos años se pensaba que las familias de genes *TAA1/TAR* y *YUCCA* operaban en vías distintas (Zhao, 2010), pero evidencias recientes han mostrado que funcionan en conjunto. Por ejemplo, la determinación directa de los niveles de IPA en mutantes *yuc* y *taa* revela que las mutantes *yuc* acumulan IPA, mientras que las mutantes *taa* son deficientes en IPA, sugiriendo que las enzimas TAA participan en la producción y los YUC están involucrados en el metabolismo del IPA (Mashiguchi *et al.*, 2011). Finalmente, ensayos *in vitro* han demostrado que las enzimas TAA pueden convertir el Trp en IPA y que las

YUC producen AIA usando el IPA como sustrato (Mashiguchi *et al.*, 2011; Won *et al.*, 2011). Los datos genéticos y bioquímicos demostraron que las enzimas TAA y YUC catalizan dos reacciones consecutivas que convierten el L-Trp a IPA y este en AIA y además que esta es la ruta principal de biosíntesis del AIA en plantas (Mashiguchi *et al.*, 2011) (Fig. 3).

2.7. Conjugación e inactivación del AIA.

La biosíntesis *de novo* no es la única fuente de AIA libre, las plantas superiores pueden almacenarlo en forma de conjugados y de ácido indol-3-butírico (IBA), que pueden proporcionar AIA libre por hidrólisis o β -oxidación, respectivamente (Tam *et al.*, 2000). El AIA puede unirse por enlaces éster a azúcares o a aminoácidos y péptidos a través de enlaces amida de forma reversible o irreversible (Fig. 3). Las funciones propuestas para estos conjugados incluyen el almacenamiento, transporte, compartimentación, desintoxicación del exceso de AIA y la protección contra la degradación peroxidativa (Cohen y Bandurski, 1982). Las diferentes especies de plantas tienen distintos perfiles de AIA conjugado, pero en ocasiones entre distintas especies pueden aparecer perfiles similares, lo que sugiere funciones ancestrales para los conjugados de AIA dentro de las plantas (Sztein *et al.*, 1999). Experimentos utilizando hidrólisis alcalina para liberar AIA de conjugados indican que *A. thaliana* mantiene aproximadamente el 90% del AIA unido a aminoácidos y péptidos por medio de enlaces amida, un 9% como conjugados por enlaces éster y cerca del 1% como AIA libre (Tam *et al.*, 2000).

Los conjugados de AIA tienen diferentes actividades *in planta*: AIA-Ala y el AIA-Leu inhiben la elongación de la raíz primaria, se ha descrito que están presentes en las semillas para ser hidrolizados durante la germinación y proporcionar AIA libre necesario en el desarrollo del embrión e incluso en esa forma pueden presentar actividad auxínica (Leclere *et al.*, 2002; Rampey *et al.*, 2004). El AIA-Ala se encuentra en niveles más altos en los brotes, mientras que

AIA-Leu se acumula en las raíces (Kowalczyk y Sandberg, 2001), pero ninguno de estos conjugado se forma a niveles detectables después de la aplicación de AIA a las plántulas o las hojas (Östin *et al.*, 1998). Estos resultados sugieren que los conjugados AIA-Ala y AIA-Leu funcionan en el suministro de AIA libre. En contraste, los conjugados AIA-Asp y AIA-Glu no son apreciablemente hidrolizados y parecen ser biológicamente inactivos. Los tejidos como las hojas en crecimiento y las raíces contienen niveles más altos de AIA libre, AIA-Asp y AIA-Glu, lo que sugiere un papel catabólico para estos conjugados (Kowalczyk y Sandberg, 2001). Las enzimas que conjugan AIA a los aminoácidos son codificadas por los miembros de la familia de genes *GH3* de respuesta temprana a auxinas, *in vitro* estas enzimas sintetizan las formas inactivas (AIA-Asp y AIA-Glu) por encima de los conjugados hidrolizables (AIA-Ala y AIA-Leu) (Staswick *et al.*, 2005). Además de los conjugados con aminoácidos, también se encuentran los conjugados esterificados con azúcares (Jackson *et al.*, 2001) y las formas metiladas que aumentan la volatilidad del AIA aunque su función aún no es clara, se sabe que se trata de una forma inactiva de la hormona (Yang *et al.*, 2008).

Los genes involucrados en el catabolismo del AIA no han sido bien identificados a la fecha pero se sabe que en *A. thaliana* permanentemente se inactiva el AIA exógeno a través de la oxidación del anillo indólico formando el ácido 2-oxoindol-3-acético (oxAIA), el cual posteriormente puede ser conjugado a glucosa (oxAIA-Glc) (Östin *et al.*, 1998) (Fig. 3). OxAIA y oxAIA-Glc se encuentran en altas concentraciones después del tratamiento con AIA exógeno, así como en líneas sobreproductoras de AIA (Novák *et al.*, 2012).

2.8. Los genes YUCCA

Las enzimas codificadas por los genes *YUCCA* pertenecen a las monooxigenasas dependientes de flavina (FMOs), son óxido-reductasas que catalizan la inserción de grupos hidroxilo a sus sustratos y en mamíferos están involucradas en la oxidación de compuestos que son eliminados (Krueger y

Williams, 2005). Aunque se han identificado monooxigenasas dependientes de flavina en todos los genomas secuenciados de plantas, a diferencia de sus homólogos de mamíferos que principalmente funcionan en la detoxificación, están involucradas en la biosíntesis de moléculas de señalización, el metabolismo de glucosinolatos y la defensa contra patógenos (Schlaich, 2007). A nivel de secuencia primaria, todas las FMOs tienen varios motivos y residuos de aminoácidos altamente conservados, por ejemplo, los motivos GXGXXG forman parte en la unión a cofactores como FAD y NADPH. Las FMOs presentan dos de ellos: el motivo GXGXXG cercano a la porción amino terminal se cree que se une al cofactor FAD y el otro localizado en la parte media, sitio putativo de unión a NADPH (Krueger y Williams, 2005; Schlaich, 2007). Por medio de ensayos bioquímicos en proteínas YUCCA recombinantes se dilucidó el mecanismo de reacción en la conversión del IPA al AIA. El primer paso es la reducción del cofactor FAD a FADH⁻ por NADPH, subsecuentemente, el FADH⁻ reacciona con el oxígeno para formar el intermediario flavin-C4a-(hidro)peroxi que finalmente oxigena al sustrato electrofílico IPA dando como resultado su conversión a AIA (Dai *et al.*, 2013).

Estudios filogenéticos muestran que las proteínas YUCCA de *Arabidopsis* pertenecen a un clado que incluye a 11 miembros (YUC1-YUC11) que se expresan en todos los tejidos de la planta pero principalmente en meristemos, primordios, tejidos vasculares y órganos reproductivos (Zhao *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2006, 2007). Genes ortólogos *YUC* se han encontrado en otras plantas incluyendo petunia (*FZY*) (Tobeña-Santamaría *et al.*, 2002), arroz (*OsYUCCA1-OsYUCCA7*) (Yamamoto *et al.*, 2007), maíz (*SPI1*) (Gallavotti *et al.*, 2008), chícharo (*PsYUC*) (Tivendale *et al.*, 2010), tomate (*ToFZY*) (Expósito-Rodríguez *et al.*, 2011), fresa (*FaYUC1-2*) (Liu *et al.*, 2013) y uva (*VvYUC1-3*) (Böttcher *et al.*, 2013). Por lo tanto, se sugiere que los genes *YUC* están altamente conservados en todo el reino vegetal.

Las mutantes con pérdida de función en los genes *YUCCA* fueron de las primeras identificadas en *Arabidopsis* con deficiencia de auxinas, la

interrupción de un solo gen *YUCCA* no presentó defectos obvios en el desarrollo debido a su función redundante. Sin embargo, algunas combinaciones de dos o más mutaciones en estos genes provocaron defectos dramáticos en el desarrollo. Por ejemplo, las mutantes dobles y triples *yuc1 yuc4* y *yuc1 yuc2 yuc6*, respectivamente, presentaron concentraciones reducidas de AIA, flores anormales sin órganos masculinos y femeninos funcionales y afectaciones en la vasculatura de hojas y flores. La mutante cuádruple *yuc1 yuc4 yuc10 yuc11* mostró alteraciones en la formación de la parte basal del embrión, fenotipo observado en la mutante cuádruple *tir1 afb1 afb2 afb3* afectada en la percepción de auxinas (Cheng *et al.*, 2007). Los fenotipos de las mutantes *yuc* fueron rescatados por la expresión del gen bacteriano de biosíntesis de auxinas *iaaM* bajo el control del promotor del gen *YUC1* pero no por la aplicación exógena de auxinas (Cheng *et al.*, 2006). Análisis de diferentes combinaciones de mutantes *yuc* mostraron claramente que la regulación de la biosíntesis de auxinas por dichos genes es esencial para la embriogénesis, la formación de tejidos vasculares, elongación celular y el desarrollo de órganos como las flores y hojas (Zhao, 2010).

La caracterización de los genes *YUCCA* comenzó con la investigación de Zhao y col. (2001), utilizando dos mutantes con ganancia de función generadas por la técnica de “*activation tagging*” (Weigel *et al.* 2000). Dichas mutantes presentaron hipocótilos alargados y su caracterización genética mostró que las inserciones de los “enhancers” estaban aproximadamente tres kilobases río-abajo de la región codificante del mismo gen. El gen fue identificado como *YUCCA*, el cual posteriormente se colocó bajo el control del promotor 35S completo rescatando el fenotipo mostrado por la mutante de “*activation tagging*”. Estas últimas mutantes fueron empleadas para estudios posteriores (Zhao *et al.*, 2001).

Además de los hipocótilos alargados, las mutantes *yucca* presentaron un fenotipo característico de elevados niveles de auxinas durante su desarrollo: en la parte aérea, las plántulas presentan cotiledones epinásticos y peciolo

elongados (Fig. 4A). Dicho fenotipo fue similar al de las mutantes sobreproductoras de auxinas como *sur1*, *sur2* y las plantas transgénicas que sobreexpresan el gen bacteriano *iaaM* (Zhao *et al.*, 2001). Las raíces de *yucca* presentaron con mayor número y longitud de pelos radiculares que las plántulas silvestres (Fig. 4B). Las plántulas crecidas en oscuridad desarrollan hipocótilos más cortos sin el gancho apical (Fig. 4C). Las hojas maduras de *yucca* fueron más pequeñas, estrechas, epinásticas y con peciolo alargados (Fig. 4D y E). Las plantas *yucca* adultas mostraron dominancia apical incrementada y crecieron de manera semi-erecta como lo hacen las plantas del género *Yucca*, razón por la cual se le dió ese nombre a la mutante (Fig. 4F) (Zhao *et al.*, 2001).

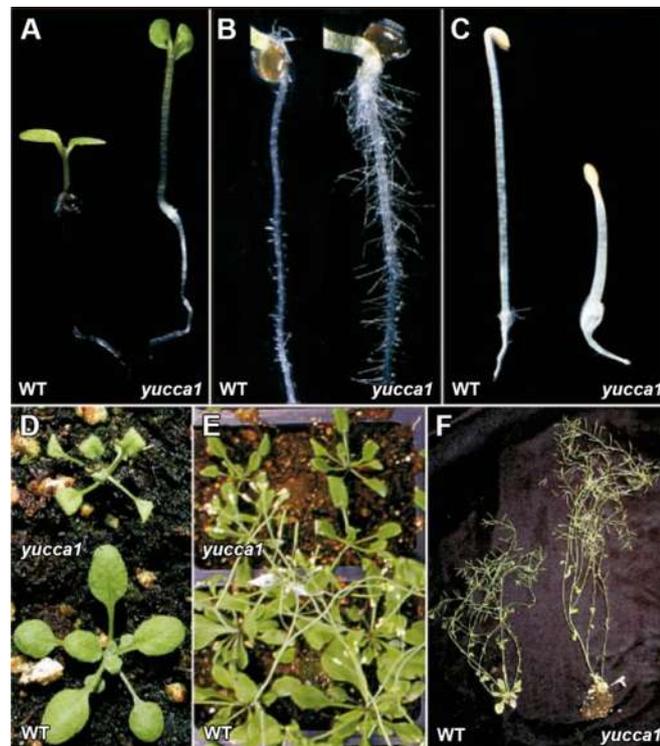


Figura 4. Identificación de la mutante *yucca1*. (A) Plántulas de silvestres (WT) y *yucca1* crecidas en medio MS 0.5X. (B) Raíces de plántulas WT y *yucca1* crecidas verticalmente en placa. (C) Plántulas de silvestres y *yucca1* crecidas en la oscuridad. (D) Plantas maduras de *yucca1* y silvestres crecidas en suelo en invernadero. (E) Crecimiento retardado de la mutante *yucca1*. (F) Dominancia apical de *yucca1* (Modificado de Zhao, 2001).

La mutante *Thread* posteriormente renombrada *yucca4* (*yuc4*) es una mutante de ganancia de función que se encuentra en el fondo genético Wassilewskija (Ws), generada por la técnica de “*activation tagging*” usando como vehículo el elemento transponible de maíz En-I y como inductor de la transcripción, cuatro potenciadores o enhancers provenientes del promotor 35S del CaMV. La mutante fue aislada por la Dra. Marsch en el Plant Research International, Wageningen, Holanda, debido a que presentaba un fenotipo similar al reportado en las mutantes sobreproductoras de auxinas. Se mapeó el gen involucrado y se encontró que la inserción del elemento activante ocurrió 828 bp río-arriba del codón de inicio del gen *YUCCA4* (Marsch-Martinez *et al.*, 2002). Sin embargo, los autores antes mencionados no caracterizaron fisiológicamente a la mutante. Por lo que en el presente trabajo se planteó realizar el análisis morfológico de la mutante *yuc4* y las consecuencias de la sobreexpresión del gen *YUCCA4* en plantas transgénicas de *A. thaliana*.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la mayoría de los estudios realizados sobre el gen *YUCCA4* se han enfocado al desarrollo del follaje con mutantes con pérdida de función y como no se ha reportado la caracterización fisiológica y bioquímica de las mutantes con sobreexpresión de este gen, el presente trabajo tiene como objetivo esclarecer su importancia en procesos de morfogénesis y respuesta a auxinas mediante el uso de líneas de activación y transgénicas de *Arabidopsis thaliana*.

4. HIPÓTESIS

La sobreexpresión del gen *YUCCA4* afecta el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana* alterando la respuesta a auxinas.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Estudiar a nivel fisiológico y molecular el efecto de la ganancia de función en el gen *YUCCA4* sobre el desarrollo y la respuesta a auxinas en *Arabidopsis thaliana*.

5.2. Objetivos específicos

- Caracterizar el crecimiento y desarrollo de una línea con ganancia de función en el gen *YUCCA4* de *A. thaliana* en condiciones *in vitro* y en suelo.
- Estudiar el impacto de la activación de *YUCCA4* en el transporte y la respuesta auxínica mediante el uso de genes reporteros.
- Generar plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresen el gen *YUCCA4* bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material biológico

En los diferentes experimentos se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Wassilewskija (Ws), así como la línea mutante *yucca4* generada por “*activation tagging*” y las transgénicas de respuesta a auxinas *BA3::GUS* (Oono *et al.*, 1998) y *HS::AXR3NT-GUS* (Gray *et al.*, 2001), además de la línea reportera de respuesta a citocininas *ARR5::GUS* (D’Agostino *et al.*, 2000). Para la transformación se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Ws y células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa pGV2260) y *Escherichia coli* (cepas Top 10 y DH5 α).

6.2. Compuestos químicos

El AIA y NPA fueron adquiridos de SIGMA-ALDRICH, ambos fueron disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO). En plántulas crecidas en condiciones control se adicionó el solvente al medio en un volumen equivalente a la concentración más alta del compuesto utilizado en el bioensayo. Los antibióticos sulfato de kanamicina, ampicilina sal sódica y rifampicina sal sódica fueron adquiridas de SIGMA-ALDRICH y disueltos en agua ultrapura estéril y metanol en el caso de la rifampicina. Los antibióticos se esterilizaron por filtración.

6.3. Preparación de la semilla

Para garantizar condiciones axénicas en los bioensayos, primeramente las semillas de las diferentes líneas se sometieron a una desinfección superficial, colocándolas en tubos eppendorf, donde se les agregó 500 μ l de etanol al 96% v/v para su agitación durante 5 min. Transcurrido este tiempo, se retiró el etanol y se adicionó 700 μ l de hipoclorito de sodio al 20% v/v, agitando por 7 min. Posteriormente, se retiró el hipoclorito de sodio y se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril. Este proceso se llevó a cabo en una campana de flujo laminar. Finalmente, las semillas fueron colocadas en

oscuridad a 4 °C durante 48 horas con el objetivo de estimular y homogeneizar la germinación.

6.4. Condiciones de crecimiento

Las semillas desinfectadas fueron sembradas y cultivadas bajo condiciones de esterilidad en cajas de Petri conteniendo 30 ml de medio de Murashige y Skoog (MS) 0.2x, el cual contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 0.6% de sacarosa y 1% de agar. El pH del medio se ajustó a 7.0 con KOH 0.1 N. Una vez preparado el medio, éste se somete a esterilización en autoclave (120 °C y 15 lb de presión durante 20 min). Al medio estéril tibio, se añade el solvente, o compuestos químicos. El medio suplementado con los diferentes compuestos, se depositó en cajas de Petri de 100 x 15 mm y se dejó solidificar para posteriormente ser rotulado y utilizado para la siembra.

Una vez preparadas las cajas de Petri con medio de cultivo en la concentración deseada de los diferentes compuestos, se procedió a la siembra de la semilla de las diferentes líneas utilizando micro-pipeta de 10 µL. Se sembraron 10 semillas por caja en la parte superior de la caja en una fila, para permitir al crecimiento libre de la raíz sobre el medio. Las cajas ya sembradas se rotularon con los datos de la semilla utilizada, el tratamiento que contiene el medio y la fecha de siembra. Finalmente, las cajas se sellaron con plástico para evitar contaminación por microorganismos.

Después de su siembra, las cajas se colocaron en una cámara de crecimiento Percival AR95L, con un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad, 22 °C y una humedad del 80%. Las cajas de Petri se colocaron en posición vertical, con un ángulo de 65° de inclinación, para permitir el crecimiento del sistema radicular, así como del sistema aéreo de las plántulas.

6.5. Variables de crecimiento y análisis de datos

Las imágenes del sistema radicular e hipocótilos de las plántulas fueron capturadas con una cámara digital SAMSUNG SCC 131-A adaptada a un microscopio estereoscópico Leica, MZ6/L2. Las fotografías de las placas y plantas en suelo se obtuvieron con una cámara réflex digital Nikon D5000. Las células epidérmicas de los hipocótilos se analizaron utilizando un microscopio de Nomarsky (Leica DM5000B) en el aumento 40X. La longitud de los hipocótilos y de las células epidérmicas se determinó con ayuda del programa ImageJ 1.44. Para todos los experimentos con líneas silvestres y mutantes, los datos fueron evaluados estadísticamente usando el programa STATISTICA 8.0 mediante un análisis por univarianza, seguida por una prueba post-hoc de Tukey. Se utilizaron letras diferentes para indicar las medias con diferencia significativa ($P < 0.05$).

6.6. Cruzas con las líneas reporteras

Se escogieron flores abiertas como donadoras de polen de plantas de *A thaliana* con el gen reportero de interés (*BA3::GUS*, *HS::AXR3NT-GUS* y *ARR5::GUS*) y como flores receptoras se eligieron botones donde se observaba la parte superior del estigma de las plantas mutantes (*yuc4*), se les removi6 los s6palos, p6talos y estambres quedando 6nicamente el carpelo. Los estambres de la flor donadora de polen se frotaron en la parte superior del carpelo para depositar el polen. Finalmente se marc6 la cruzada realizada colocando un hilo en el ped6nculo. Se dej6 madurar y secar la silicua para luego colectar las semillas coloc6ndola en tubos eppendorf perfectamente rotulados y se dejaron secar a temperatura ambiente durante dos semanas. Las semillas colectadas se desinfectaron y sembraron para comprobar el fenotipo mutante y la presencia del gen reportero, se seleccionaron las plantas que presentaron ambas caracter6sticas, las cuales se volvieron a sembrar para obtener las semillas homocigotas.

6.7. Análisis de expresión del gen de la β -glucoronidasa (GUS)

Para el análisis histoquímico de la actividad de la β -glucoronidasa, plántulas transgénicas de *A. thaliana* que expresa los genes marcadores fueron sumergidas en el amortiguador de reacción (0.5 mg ml^{-1} de 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-gluocurónido en fosfato de sodio 100 mM, pH=7) para posteriormente incubarse 14 horas a 37 °C. Para cada ensayo al menos diez plántulas fueron analizadas y se eligió una representativa para ser fotografiada utilizando el microscopio Leica CME.

6.8. Clarificación de tejidos

Las plántulas teñidas fueron clareadas mediante el método descrito por Malamy y Benfey en 1997. Primeramente se eliminó el buffer de tinción, se agregó 1 ml de la solución I (HCl 0.24N y metanol 20%), se incubó a 62°C durante 60 min. Se retiró la solución I y se agregó 1 ml de solución II (NaOH 7% y etanol 60%), se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Se retiró la solución II, y se adicionó 1 ml de etanol 40% y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Se retiró el etanol 40%, para agregar 1 ml de etanol 20% y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Se retiró el etanol 20%, para adicionar 1 ml de etanol 10% y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Se retiró el etanol y se agregó 1 ml de glicerol 50%. Finalmente el tejido fue montado en portaobjetos de cristal con glicerol al 50% y se observó al microscopio.

6.9. Extracción de ADN genómico de *Arabidopsis*

El tejido foliar y radicular de *A. thaliana* fue macerado perfectamente con ayuda de nitrógeno líquido, se colocaron de 50 a 100 mg en un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril y se homogenizó con 500 μL del buffer de extracción (200 mM Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, SDS al 0.5%). La muestra se agitó durante 5 seg para luego ser centrifugadas a 12 000 rpm durante 5 min;

se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo, el cual se mezcló por inmersión con un volumen igual de una mezcla compuesta por fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo. Para precipitar el ADN, el sobrenadante se mezcló con 2/3 (v/v) de isopropanol frío y se dejó reposar durante 10 min para luego ser centrifugado a 12 000 rpm durante 10 min. Se decantó el sobrenadante, se lavó la pastilla dos veces con etanol al 70% y se dejó evaporar colocando el tubo abierto e invertido sobre papel absorbente. Finalmente, se resuspendió la pastilla en 100 µL de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) o agua desionizada estéril.

6.10. Amplificación y clonación del gen *YUCCA4*

El ADN genómico del ecotipo Ws de *A. thaliana* se utilizó como molde para la amplificación del gen *YUCCA4* por PCR utilizando los siguientes reactivos: 4 µl de buffer 5X Phusion HF, 0.4 µl de dNTPs 10µM, 1 µl del oligonucleótido directo 10mM (5´- CAC CAT GGG CAC TTG TAG AGA A -3´), 1 µl del oligonucleótido reverso 10mM (5´- TCA CAT ATA CAT ATA CAC ATT GAC -3´), 0.2µl de ADN polimerasa Phusion® Hot Star, 1µl de ADN y 12.4 µl de agua desionizada estéril. La reacción se colocó en un termociclador bajo el siguiente programa: desnaturalización inicial a 98°C por 30 seg; 30 ciclos de 98°C por 10 s, 54 °C por 30 seg y 72 °C por 45 seg, y una extensión final a 72 °C por 5 min. El producto de PCR (1933 pb) fue visualizado por medio de electroforesis en gel de agarosa y finalmente fue clonado en el vector pENTR™/D-TOPO®, para lo cual se colocaron 0.5 µL del plásmido, 0.5 µL de solución salina y 2 µL del producto de PCR y se incubó la mezcla de reacción durante una hora a temperatura ambiente. Con el plásmido clonado se transformaron células competentes de la cepa Top 10 de *E. coli*.

6.11. Transformación de *Escherichia coli* por choque térmico

Las células competentes de *Escherichia coli*, se descongelaron y colocaron en hielo. Se agregó 2 µL del material genético, y se incubaron en

hielo por 30 min para posteriormente someter las células a un choque térmico de 30 seg a 42 °C en un baño maría sin agitación. Una vez transcurrido este tiempo, rápidamente se enfriaron en hielo durante 2 min para luego añadir 1 ml de medio de cultivo líquido, donde se incubaron 1 hora a 37°C en agitación. Se sembraron 100 µL del cultivo y 50 µL del paquete celular del mismo cultivo obtenido por centrifugación en placas con medio Luria-Bertani (LB) sólido suplementadas con el antibiótico de selección (kanamicina 50 µg/ml), donde se incubaron toda la noche a 37°C.

6.12. PCR de colonia

Para rastrear rápidamente la presencia de plásmidos que contengan el inserto del gen en bacterias transformadas, se realizó un PCR de colonia. La reacción se llevó a cabo en un volumen aproximado de 25 µL con: 2.5 µL de buffer 10x, 0.5 µL de dNTPs 10 mM, 0.5 µL de MgCl₂ 50 mM, 2 µL del par de oligonucleótidos para el inserto a 10 mM, 0.5 µL de Taq DNA Polimerasa, 19 µL de agua libre de DNAsas y RNAsas y como templado se añadió una pequeña porción de cada colonia seleccionada con la ayuda de un palillo de madera previamente esterilizado. El programa de amplificación utilizado fue: 1 ciclo de 5 min a 95°C para la lisis celular y desnaturalización del DNA, 30 ciclos de 1 min a 95°C, 2 min a 54°C, y 1 min a 72°C cada uno, y una extensión final de 5 min a 72°C. La amplificación fue visualizada por medio de electroforesis en gel de agarosa.

6.13. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Los productos del PCR y los análisis de restricción de los plásmidos se resolvieron en geles de agarosa al 0.8 %. Cada gel se preparó fundiendo 0.8 g de agarosa en 100 ml de buffer TBE 0.5 X. A 30 ml de esta disolución se le adicionaron 0.2 µl de colorante para DNA (Gel Red® Nucleic Acid Gel Stains, Biotium) para facilitar la visualización de los ácidos nucleicos en luz ultravioleta (UV). Una vez agregado el colorante, la disolución se vació en el molde de la

cámara de electroforesis, a la que se le colocó un peine y se dejó solidificar. Las muestras se mezclaron con 2 µl de buffer de carga 6X Orange (6X Loading Dye Solution, Fermentas) y se cargaron en los pozos del gel. En un extremo del gel se colocó un marcador de peso molecular (1 KB Plus DNA Ladder - Life Technologies). La electroforesis se llevó a cabo en buffer TBE 0.5X a 120 voltios durante una hora aproximadamente. Al finalizar la corrida, los geles se observaron en un transiluminador y se tomó la foto correspondiente para su análisis posterior.

6.14. Extracción de ADN plasmídico

El DNA plasmídico se recuperó por medio del protocolo modificado de Birnboim y Doly, 1979. Se obtuvieron los paquetes celulares de la bacteria, por centrifugación de un cultivo crecido durante toda la noche con el plásmido a purificar y se resuspendieron en 150 µL de solución I BD (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 50 mM Glucosa, 0.1 mg/mL RNAasa). Posteriormente, se agregaron 300 µL de la solución II BD (0.2 N NaOH, 1% SDS) y se homogenizó por 1 min usando un agitador orbital, se dejó reposar 5 min en hielo. Se agregaron 300 µL de la solución III BD (1.75 M acetato de potasio, 6.7% ácido acético glacial), se mezcló perfectamente por inversión y se dejó reposar en hielo por 10 min. Se procedió con una centrifugación por 10 min a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo para microcentrífuga nuevo y estéril. Se añadieron 700 µL de isopropanol, se mezcló por inversión y se dejó reposar 10 min en hielo, se continuó con una centrifugación por 15 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Para eliminar el exceso de sales, se agregó 1 ml de etanol al 70%, se resuspendió con un agitador orbital por 30 seg y se centrifugó nuevamente 5 min, se eliminó el sobrenadante. La pastilla se secó con el tubo destapado e invertido sobre papel absorbente el tiempo necesario y finalmente se resuspendió en 40 µL de agua bidestilada estéril.

6.15. Análisis de restricción de plásmidos

Este análisis se realizó primeramente *in silico* con ayuda del programa Serial Cloner 2.6.1., se introdujo la secuencia del plásmido, se seleccionaron la(s) enzima(s) de restricción para linearizarlo o escindirlo en los sitios de interés y el programa nos mostró el tamaño de bandas esperado en cada análisis. El protocolo general *in vitro* consiste en preparar una mezcla de los siguientes componentes: 1-2 μL de plásmido, 0.5 μL de la enzima, 2 μL del buffer especificado para la enzima y 14.5-15.5 μL de agua desionizada estéril, la mezcla se incubó a 37°C por una hora, seguido de una electroforesis.

6.16. Secuenciación

Se obtuvo el ADN plasmídico de células transformadas con el vector pENTR™/D-TOPO® conteniendo el inserto del gen *YUCCA4*, 100 ng aproximadamente, se enviaron secuenciar al departamento de Servicios Genómicos del LANGEBIO, CINVESTAV-Campus Irapuato con los oligos, directo y reverso del gen *YUCCA4* (YUC4f 5'- CAC CAT GGG CAC TTG TAG AGA A -3' y YUC4r 5'- TCA CAT ATA CAT ATA CAC ATT GAC -3') y dos oligos para el plásmido (T7 5'- AAT ACG ACT CAC TAT AG-3' y UNIVERSAL 5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'). A partir de cada oligo se obtuvo una secuencia, las cuatro se acoplaron para formar una secuencia final usando el programa Serial Cloner 2.6.1. y se realizó la comparación *in silico* con la secuencia del gen reportada en internet.

6.17. Recombinación

En un tubo para microcentrifuga se colocó 1-7 μL del vector de entrada (pENTR™/D-TOPO® + YUC4), 1 μL del vector destino (pEarleyGate 100), procurando concentraciones similares (100 ng aprox.) y 1 μL de Gateway LR Clonase®, se dejó incubando una hora a temperatura ambiente. Con el producto de reacción se transformó la cepa DH5 α por choque térmico *E. coli*, de donde

se purificó el plásmido recombinado y se comprobó su correcta recombinación por medio de análisis de restricción.

6.18. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Para transformar *A. tumefaciens*, se mezclaron 5 µl (100 ng aprox.) de ADN plasmídico con 50 µl de células electrocompetentes de *A. tumefaciens* cepa pGV2260 y se dejó incubando en hielo por 3 min. La mezcla se colocó en una cubeta para electroporación de 0.2 cm, una vez tapada se aplicó un pulso eléctrico con un electroporador BIORAD (400 Ohms, 25 µFD y 2.5 kV). Se recuperó la mezcla, se adicionaron 200 µl de medio SOC (2% bacto-triptona, 0.5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 25 mM KCl, 50 mM MgCl, 20 mM glucosa) y se dejó incubando a 28°C con agitación durante 2 h. Con la finalidad de concentrar la mezcla se centrifugó a 12,000 rpm durante 30 seg y se eliminaron $\frac{3}{4}$ del volumen total del medio, se resuspendió la pastilla en el volumen restante, se sembró en medio LB sólido con los antibióticos de selección y se dejó incubando a 28°C durante 48 hrs. Las colonias bacterianas resistentes fueron comprobadas mediante un PCR en colonia utilizando los oligos antes descritos para amplificar el gen *YUCCA4* y para el promotor 35S (oligos: 35Sf 5'-CCT TAA TTA AAA CCC TCT CCA AAT GAA ATG AAC-3' y 35f 5' - CCG GTA CCA TTC TAC TCC AAA AAT ATC AAA GAT ACA G-3'). De las colonias positivas se tomó un inóculo que se colocó en 10 ml de medio LB líquido con los antibióticos de selección y se incubó durante 30 h en agitación a 28°C para realizar extracción de ADN plasmídico y el posterior análisis de restricción.

6.19. Transformación de *Arabidopsis thaliana*

Se usaron plantas de *Arabidopsis*, ecotipo Ws cultivadas en invernadero a 22°C bajo condiciones de luz de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) en una mezcla de sustratos compuesta por 3 partes de peat moss, 1 parte de perlita y 1 parte de vermiculita (mezcla para *Arabidopsis*). Plantas de

entre 5 y 10 cm con inflorescencias fueron transformadas con células de *A. tumefaciens* conteniendo el vector destino con el fragmento deseado provenientes de un cultivo de 10 ml en medio LB de 24 hrs a 28°C con agitación y centrifugado a 5 500 rpm durante 20 min. La transformación se realizó por el método de “Floral dip” (Clough y Bent, 1998) modificado, cada inflorescencia se sumergió por separado en la mezcla de transformación que contiene sales MS (2.3 g/L), sacarosa (50 g/L), el surfactante Silwet L-77 (200 µL/L) y células transformadas de *Agrobacterium*. El proceso se repitió 3 veces cada 3 días, las plantas se dejaron crecer de manera normal. Las semillas producidas fueron colectadas, secadas durante 5 días y almacenadas en obscuridad a temperatura ambiente para su posterior siembra y selección.

6.20. Selección de plantas transformantes de *Arabidopsis thaliana*

Las semillas recolectadas de las plantas transformadas fueron desinfectadas y sembradas en placas con medio MS al que se añadió 50 µg/mL de glufosinato de amonio (BASTA) antes de solidificar. Las semillas se dejaron crecer en una cámara de crecimiento durante 20 días a 22°C con fotoperiodos de 16 horas de luz y 8 horas de obscuridad. Transcurrido este tiempo las plantas que no fueron afectadas por el herbicida se trasplantaron a macetas con sustrato especial para *Arabidopsis*. Para comprobar la inserción del T-DNA en las plantas, se extrajo ADN genómico de cada planta para detectar el promotor 35S (Oligos 35Sf y 35Sr) por medio de PCR. La genotipificación se realizó mediante una amplificación utilizando el oligo directo del promotor 35S (35Sf) y el reverso de *YUCCA4* (YUC4r) usando el ADN genómico como molde. Las plantas transformantes genotipificadas se dejaron crecer normalmente, se obtuvieron las semillas homocigotas de cada planta por separado. Dichas semillas se desinfectaron y sembraron en placas con medio MS 0.2x donde se seleccionaron las plántulas con fenotipo *thread/yuc4*.

7. RESULTADOS

7.1. Caracterización de la mutante de *Arabidopsis thaliana yucca4 (yuc4)* obtenida por “activation tagging”.

Con el objetivo de caracterizar la mutante *yuc4* se realizó la comparación fenotípica con plantas silvestres del ecotipo Wassilewskija (Ws). Se crecieron plantas de la línea silvestre y de la mutante *yuc4* generada por “*activation tagging*” en placas de Petri con medio MS 0.2x, a los 10 días después de la germinación (ddg), la mutante mostró hipocótilos y peciolo alargados, cotiledones epinásticos, mayor longitud en la raíz primaria y mayor cantidad de raíces laterales (Fig. 5A), además presentó mayor longitud y número de pelos radiculares (Fig 5B). En suelo, a las 5 semanas de edad, la mutante exhibió crecimiento retardado y menor cantidad de estructuras aéreas como hojas, flores, silicuas y tallos, los cuales fueron más delgados provocando una inclinación en su crecimiento (Fig. 5C). El fenotipo alterado en la mutante *yuc4* corresponde al descrito en la literatura como una mutante sobreproductora de auxinas (Zhao *et al.* 2001).

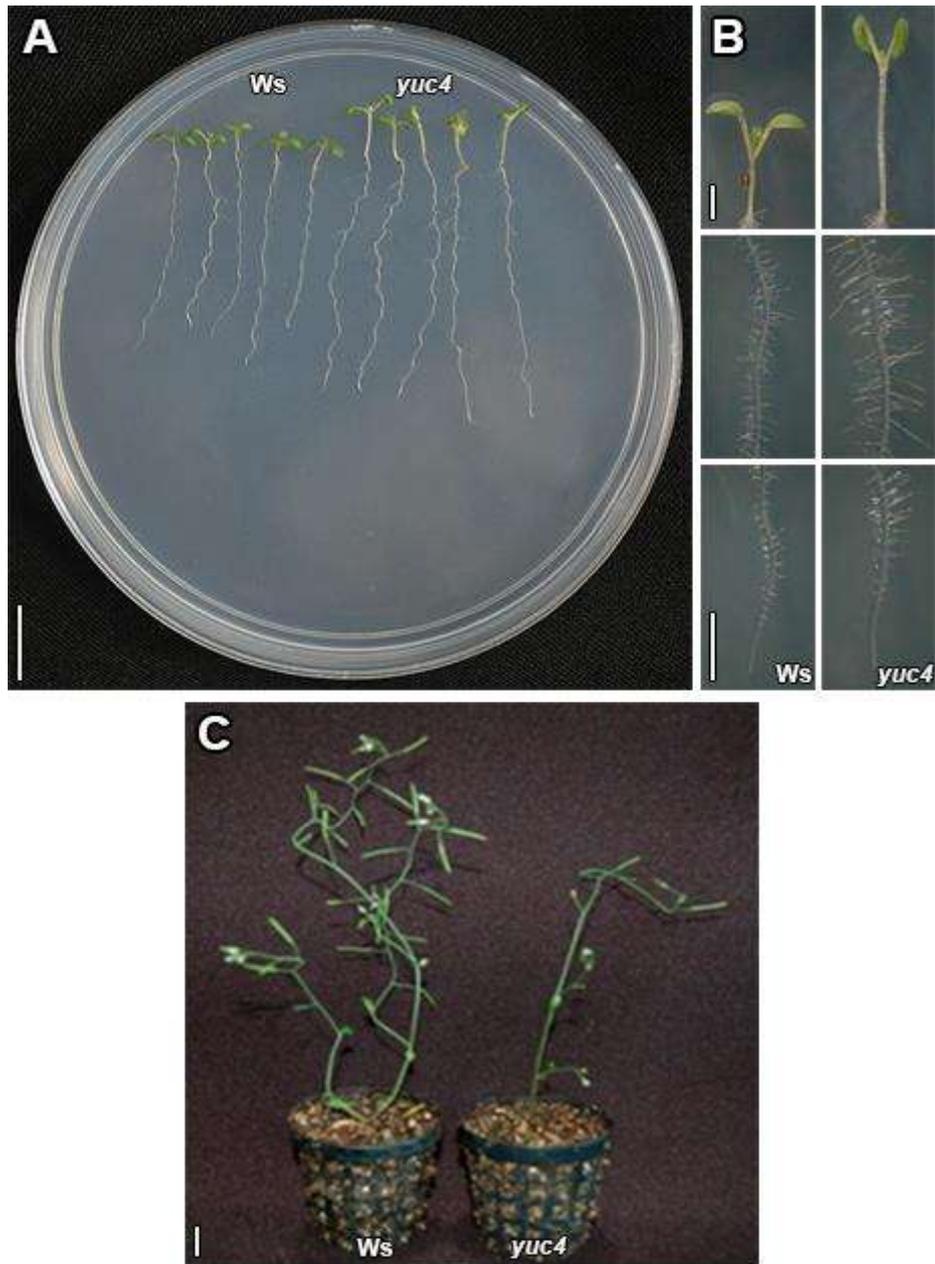


Figura 5. Crecimiento de plantas silvestres y la mutante *yuc4*. (A) Crecimiento en placa de plántulas de ecotipo *Ws* y la mutante *yuc4* a los 10 ddg germinadas y crecidas en medio MS 0.2x. Barra = 1 cm. (B) Imágenes representativas de tres diferentes zonas (follaje, zona media y apical de la raíz) de plántulas del ecotipo *Ws* y la mutante *yuc4*, 10 ddg. Barras = 1 mm. (C) Crecimiento de las plantas en suelo a las 5 semanas de edad. Barra = 1 cm.

7.2. La mutante *yuc4* tiene un programa de elongación celular alterado.

Para determinar si el incremento en la longitud del hipocótilo en la mutante era debido a una mayor elongación celular, se sembraron semillas tanto de la línea silvestre como de la mutante en medio MS 0.2x. A los 10 ddg se realizó el clareo de las plántulas para proceder a tomar fotografías de las células epidérmicas de la parte media de los hipocótilos y determinar su longitud. En la figura 6, se muestra el promedio de la longitud de 100 células epidérmicas de 10 plantas diferentes *Ws* y la mutante *yuc4*. Las células epidérmicas de la mutante presentan 20% mayor longitud (Fig. 6A). Además, se aprecia que las células epidérmicas en la mutante son más delgadas (Fig. 6B). La determinación de este parámetro sugiere que la mutante tiene un programa de elongación celular alterado.

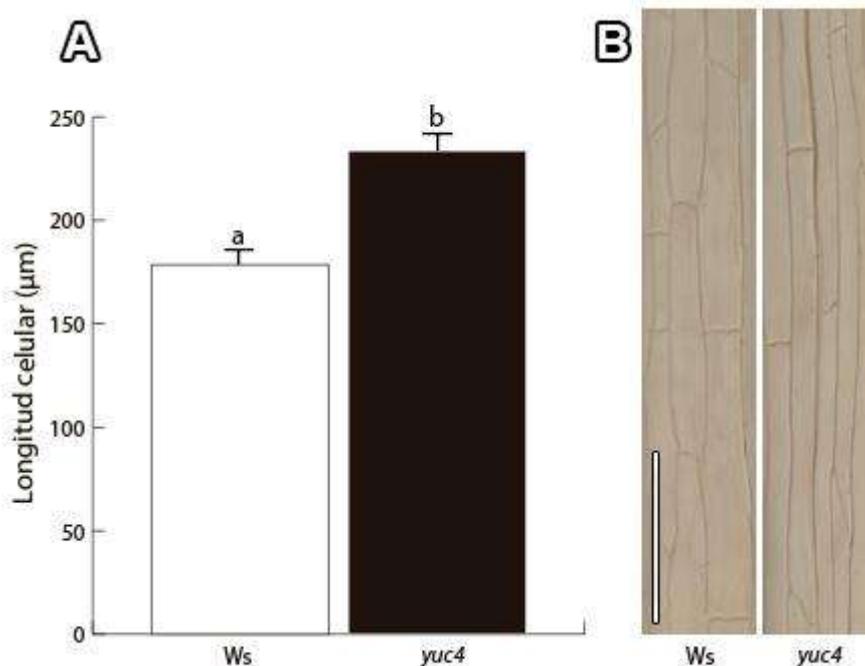


Figura 6. Longitud de células epidérmicas en plantas silvestres y *yuc4*. (A) Mediante análisis por microscopía óptica se determinó la longitud de células epidérmicas de la zona media del hipocótilo de 10 plántulas de *Arabidopsis* del ecotipo *Ws* y la mutante *yuc4* a los 10 ddg, se evaluaron 10 células por plántula (n = 100 células). (B) Imágenes representativas de la zona media del hipocótilo de plántulas silvestres y *yuc4*, 10 ddg. Barra = 100 µm.

7.3. *yuc4* muestra mayor respuesta a auxinas

Para estimar la cantidad y actividad de auxinas en la mutante *yuc4*, se utilizaron líneas reporteras de respuesta a auxinas. En tales líneas, se hace uso de elementos promotores de genes de respuesta temprana a auxinas, que proporcionan una herramienta para rastrear la acción y localización espacio-temporal de las auxinas (Ulmasov *et al.*, 1997).

Se evaluó la línea *BA3::GUS*, la cual tiene el gen de la β -glucoronidasa bajo el control de un promotor inducible por auxinas, este promotor fue construido con los dominios de respuesta a auxinas A y B del gen de respuesta temprana a auxinas *IAA4/5* de chícharo (Oono *et al.*, 1998). Como control negativo, plántulas de la línea reportera de 10 ddg crecidas en medio MS, fueron teñidas y clareadas. De manera normal, las plántulas expresan el reportero en los peciolos, hipocótilo, y tejidos vasculares de manera muy discreta (Fig. 7). Plántulas de la misma edad tratadas con 2 μ M de AIA como control positivo, mostraron un incremento en la expresión del reportero, que se extendió en peciolos, haces vasculares e incluso en el meristemo apical de la raíz (Fig. 7). Se movilizó el gen reportero a la mutante *yuc4* por medio de una cruza, después de ser teñidas y clareadas se observó una expresión intensa en prácticamente toda la planta (Fig. 7), esto sugiere que *yuc4* posiblemente posee niveles elevados de auxinas lo que podría explicar su fenotipo similar al de una mutante sobreproductora de auxinas anteriormente descrito. En base a la intensidad y patrón de expresión que mostró el reportero en la mutante *yuc4* se puede sugerir que estas auxinas pudieran ser de otros tipos además de AIA.

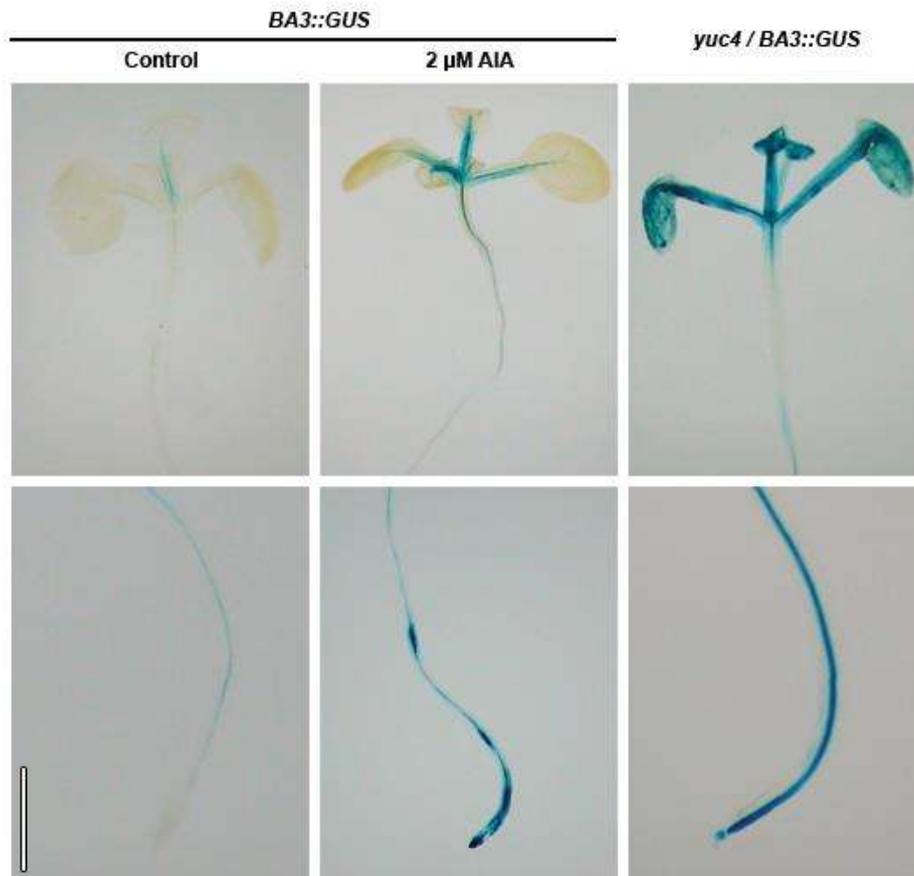


Figura 7. Expresión del gen reportero *BA3::GUS*. Semillas de la línea *BA3::GUS* y la cruz *yuc4 / BA3::GUS* fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2x. A los 10 ddg las plántulas fueron teñidas con X-gluc y posteriormente clareadas. Para el control positivo, las plántulas fueron colocadas en medio MS líquido suplementado con 2 μ M de AIA durante 5 horas para luego ser teñidas y clareadas. Se muestran imágenes significativas de al menos 20 plantas teñidas. Barra = 1 mm.

7.4. *yuc4* presenta actividad constante del sistema ubiquitina-proteosoma activado por auxinas.

Uno de los principales componentes que regulan la señalización auxínica son las proteínas represoras AUX/IAA, que impiden la activación de los factores transcripcionales ARFs que permiten la expresión de los genes regulados por auxinas. Las proteínas AUX/IAAs son degradadas en respuesta al aumento de los niveles de auxinas, a través del sistema ubiquitina

proteosoma permitiendo la expresión de los genes de respuesta temprana a auxinas (Fig. 2). Para evaluar el estado de la señalización por auxinas en la mutante *yuc4*, se utilizó la línea reportera *HS:AXR3NT-GUS*, la cual presenta la β -glucoronidasa unida al dominio amino terminal de la proteína AXR3, que pertenece a la familia de represores transcripcionales AUX/IAA (IAA17). La construcción está bajo el control de un promotor inducible por choque térmico (HS), cuando las plántulas se incuban a 37°C por 2 horas se induce la expresión del represor unido a la glucoronidasa (Gray *et al.*, 2001). Plántulas de la línea reportera fueron sumergidas en medio líquido y sometidas al choque térmico, posteriormente teñidas y clareadas, debido a la actividad de la glucoronidasa fusionada a la proteína represora se observó una expresión evidenciada por la coloración azul principalmente en hojas y en raíz primaria (Fig. 8). En plántulas de la misma edad tratadas con 2 μ M de AIA como control positivo, la expresión del reportero desapareció a causa de la degradación de la fusión proteica por acción del proteosoma 26S posterior a su ubiquitinación por el complejo SCF^{TIR} debido a la presencia de niveles elevados de auxinas (Fig. 2). Al movilizar el gen reportero a la mutante y bajo las mismas condiciones de crecimiento, choque térmico, tinción y clareo, se observó la desaparición de la fusión de manera similar al control positivo (Fig. 8). Este estudio pone de manifiesto que en la mutante *yuc4* existe una actividad constante del sistema ubiquitina proteosoma causado por una posible sobreproducción de auxinas que puede estar degradando constantemente a los represores transcripcionales, provocando así una mayor respuesta a auxinas.

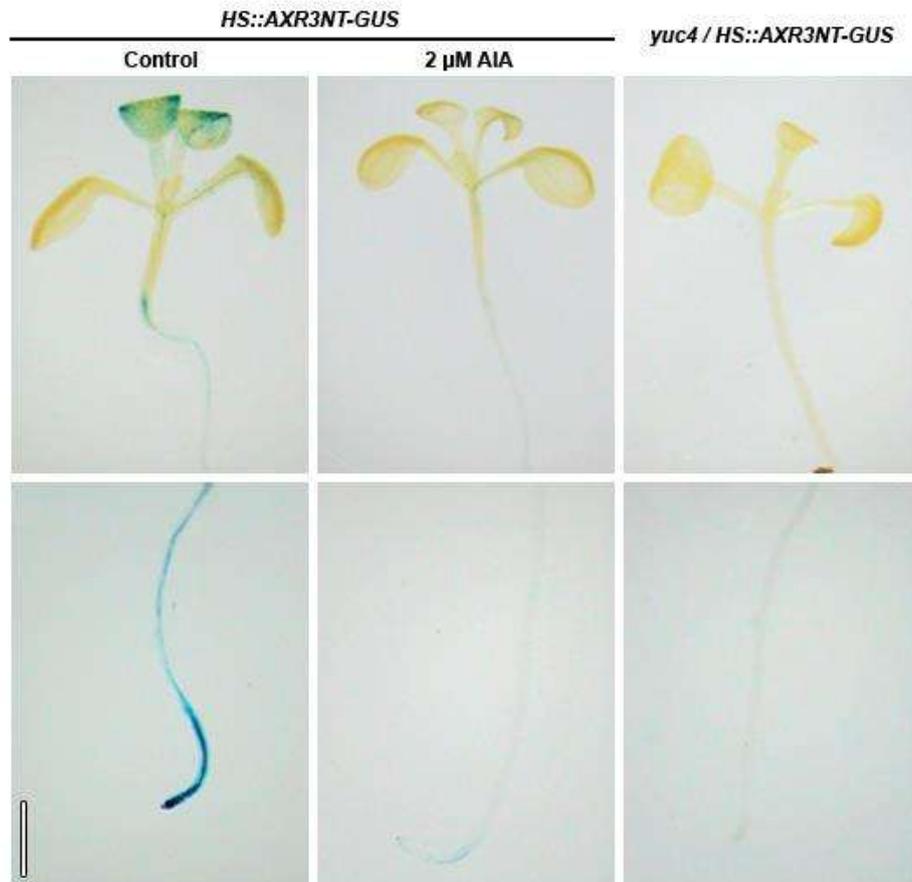


Figura 8. Expresión del gen reportero *HS::AXR3NT-GUS*. Fotografías representativas de al menos 15 plántulas a los 10 ddg de la línea reportera *HS::AXR3NT-GUS* crecidas en medio MS 2.0x sin tratamiento (control negativo) y tratadas con 2 μ M de AIA (control positivo) y de la cruz *yuc4 / HS::AXR3NT-GUS*. Las plántulas fueron sometidas a choque térmico durante 2 horas a 37 °C y posteriormente teñidas y clareadas. Barra = 1 mm.

7.5. El ácido naftilalámico (NPA) disminuye la elongación del hipocótilo en *yuc4*

Debido a que las auxinas son mayormente sintetizadas en el meristemo apical del tallo y en hojas jóvenes (Ljung *et al.*, 2001), se hipotetizó que el incremento en los niveles de auxinas pudiera reflejarse en un transporte incrementado de las mismas hacia la raíz. Para evaluar esto se utilizó el NPA, un compuesto que afecta el transporte polar de auxinas actuando sobre el sistema de tráfico vesicular lo que impide el establecimiento de los

transportadores de eflujo de auxinas PIN en la membrana plasmática (Nishimura *et al.*, 2012). Las semillas silvestres de *Arabidopsis* y *yuc4* fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2x en presencia del disolvente DMSO como control o en concentraciones crecientes de NPA (1, 2, 4 y 8 μ M). A los 10 ddg se tomaron fotografías de la parte aérea de las plántulas y se determinó la longitud promedio de los hipocótilos con el programa ImageJ 1.44. A partir de 1 μ M de NPA se estimuló significativamente el acortamiento del hipocótilo en ambas líneas a casi la mitad de su longitud comparadas con el control. A concentraciones de NPA más elevadas, la longitud del hipocótilo en las plántulas silvestres permaneció sin cambios significativos; sin embargo, la mutante mostró mayor disminución incluso alcanzando la misma longitud de las plántulas silvestres en condiciones control (Fig. 9). En la figura 9B, se muestran fotografías representativas de plántulas donde se aprecia el efecto del NPA sobre la longitud del hipocótilo. Los resultados sugieren que la elongación del hipocótilo puede deberse a un transporte aumentado de auxinas que se normaliza por efecto del bloqueador.

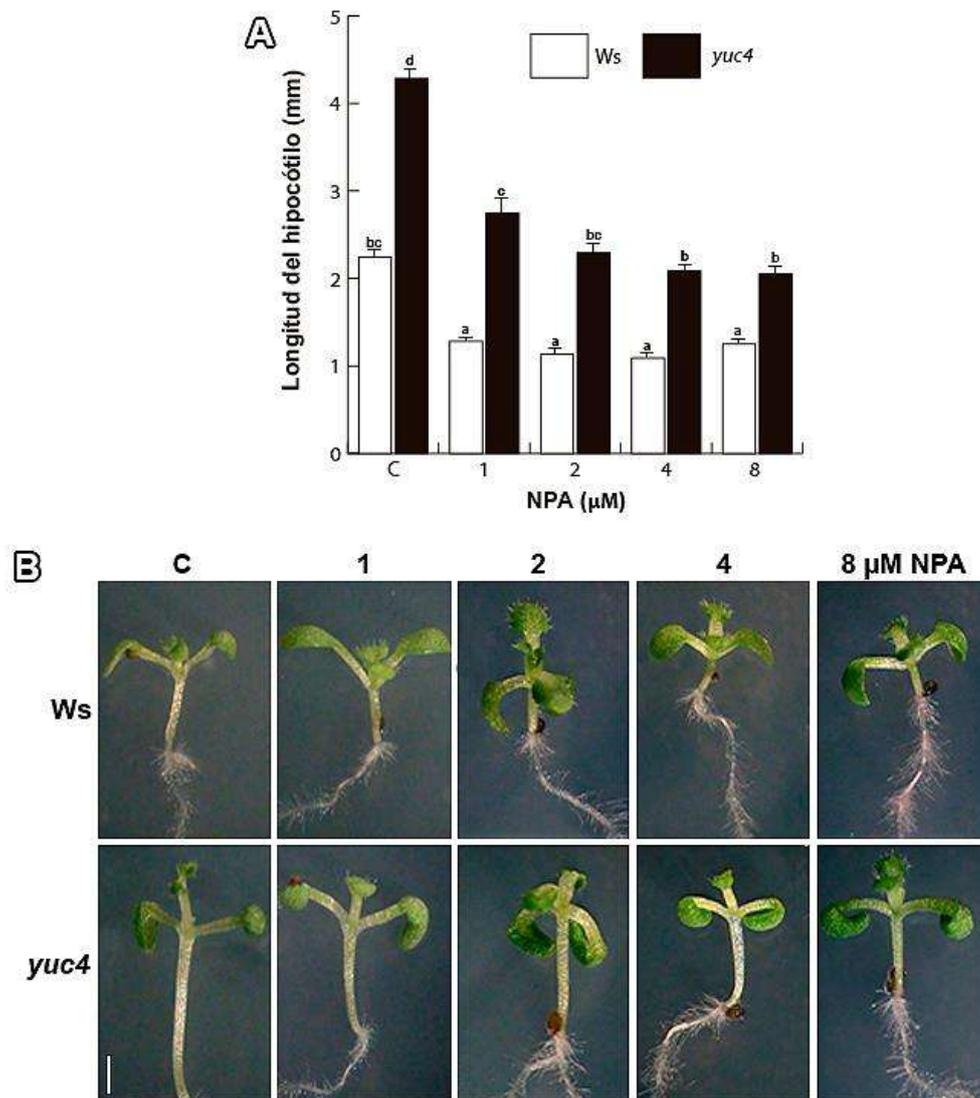


Figura 9. Efecto del NPA sobre la longitud del hipocótilo de plántulas silvestres y de la mutante *yuc4*. (A) Semillas del ecotipo *Ws* y la mutante *yuc4* fueron germinadas y crecidas en en medio MS 0.2x con solvente (control), 1, 2, 4 y 8 μM de NPA. A los 10 ddg se determinó la longitud del hipocótilo midiendo desde el nudo cotiledonar a la zona de transición entre raíz y tallo. La gráfica muestra la media ± error estándar (n=15). Las letras indican una diferencia estadística con una $P < 0.05$. (B) Efecto sobre el hipocótilo de plántulas sometidas al tratamiento de concentraciones crecientes de NPA. Barra = 1 mm. El experimento fue repetido tres veces con resultados similares.

7.6. La mutante *yuc4* no presenta niveles alterados de citocininas

La serie experimental anterior proporciona evidencias de un aumento en los niveles y respuesta auxínica en la mutante *yuc4*; por otra parte, se ha

descrito que las auxinas juegan un papel central en la red compleja de interacciones hormonales dentro de la planta (Swarup *et al.* 2002). Se decidió averiguar si el fenotipo observado involucraba la respuesta alterada de otras hormonas, por ejemplo citocininas, ya que se ha sugerido que actúan regulando de manera negativa la biosíntesis del AIA y viceversa (Nordström *et al.*, 2004; Eklöf *et al.*, 2000). Para evaluar la respuesta a citocininas, se empleó la línea reportera *ARR5::GUS* la cual tiene el gen de la β -glucoronidasa bajo el control del promotor del gen *ARR5*, un gen que es regulado transcripcionalmente en respuesta a citocininas. La línea permite la detección histoquímica de la actividad de este promotor para determinar la presencia de citocininas activas en los tejidos (Shtratnikova y Kulaeva, 2008). Por medio de cruza, se movilizó el reportero a la mutante, se sembraron y crecieron semillas de la cruza y la línea reportera en placas con medio MS, a los 10 ddg se tiñeron y clarearon. En la línea reportera, la expresión se aprecia claramente en todo el follaje, pero con mayor intensidad en los haces vasculares, raíz primaria y en el meristemo apical. En el caso de la mutante observamos que no hay diferencias en los patrones de expresión de este marcador respecto a las plantas reporteras normales (Fig. 10). Lo anterior nos sugiere que para el caso de la respuesta a citocininas no parece existir una alteración debida a la probable sobreproducción de auxinas.

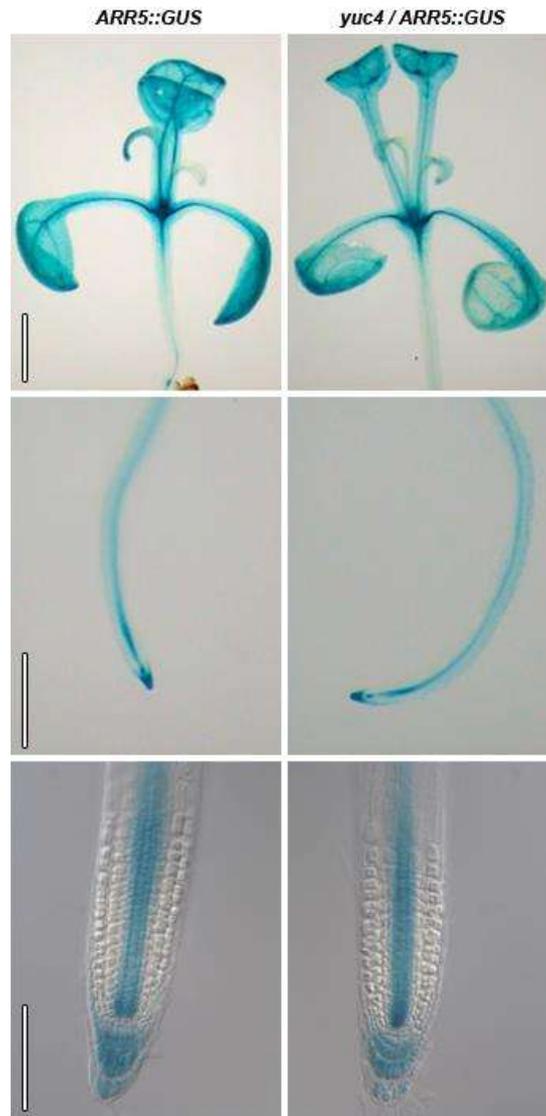


Figura 10. Expresión del gen reportero *ARR5::GUS*. (A) Plántulas de la línea transgénica *ARR5::GUS* y la cruz *yuc4 / ARR5::GUS* de 10 días de edad fueron teñidas y clareadas para su análisis por microscopía. Se muestran fotografías representativas del follaje, raíz y meristemo apical de la raíz. Barras = 1 mm, 1mm y 100 μ m respectivamente.

Los resultados indican que la mutante tiene alterados los procesos de elongación celular y su desarrollo debido a un incremento en la respuesta auxínica; sin embargo, no se descarta la posibilidad de que este fenotipo se deba a que otros genes pudieran verse afectados por la acción de los enhancers o potenciadores. Además, para provocar la expresión ectópica y constitutiva del gen y corroborar el fenotipo observado en las mutantes generadas por “*activation tagging*”, se realizó la transformación de *Arabidopsis thaliana* para la generación de plantas transgénicas que sobreexpresen fuerte y constitutivamente el gen *YUCCA4* bajo el control del promotor 35S del CaMV.

7.7. Amplificación y clonación del gen *YUCCA4*

Para corroborar que el fenotipo de la mutante *thread/yuc4* ocurre por la sobreexpresión de *YUCCA4*, se decidió transformar plantas de *A. thaliana* con la secuencia genómica de este gen. Para ello se realizó una extracción de ADN genómico de plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana*, el cual se utilizó como molde para la amplificación del gen *YUCCA4* por medio de PCR. La secuencia del oligo directo fue: 5´- CAC CAT GGG CAC TTG TAG AGA A -3´ y del oligo reverso: 5´- TCA CAT ATA CAT ATA CAC ATT GAC -3´, ambos fueron diseñados para flanquear el marco de lectura abierto del gen, dando como resultado una secuencia de 1933 pb (Fig. 11A). El oligo directo incluye la secuencia CACC en la terminación 5´, esta facilita su clonación direccional en el vector pENTR™/D-TOPO® (Fig. 11B). Este vector tiene unidas covalentemente topoisomerasas que catalizan la ligación del inserto. Además de facilitar la clonación direccional, este plásmido permite secuenciar el gen y se emplea como vector de entrada para la recombinación ya que los sitios de recombinación attL1 y attL2 flanquearán el inserto del gen *YUCCA4* (Fig 11C). Con este último plásmido se transformó la cepa Top 10 de *E. coli* por medio de choque térmico, la cual se sembró en medio LB con kanamicina y se incubó toda la noche a 37°C. Posteriormente seleccionaron colonias resistentes a las cuales se les realizó un PCR para corroborar la presencia del inserto (Fig. 12A). A las colonias positivas con el inserto se les realizó una extracción y

purificación de ADN plasmídico, seguida de un análisis de restricción con la enzimas de restricción EcoRI y NotI lo que permitió corroborar el tamaño total del vector y la presencia del inserto (Fig. 12B y 12C).

Una vez comprobado que el vector contenía el inserto se mandó secuenciar al laboratorio de servicios genómicos del LANGEBIO, esto se realizó con cuatro oligos, el directo y reverso utilizados para la amplificación de *YUCCA4* y 2 dos oligos para el vector (T7 5'- AAT ACG ACT CAC TAT AG-3' y UNIVERSAL 5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'). Las 4 secuencias obtenidas se acoplaron *in silico* utilizando el programa Serial Cloner 2.6.1. para generar una secuencia final que se comparó con la secuencia genómica del gen *YUCCA4* del ecotipo Col-0 reportada en las bases de datos.

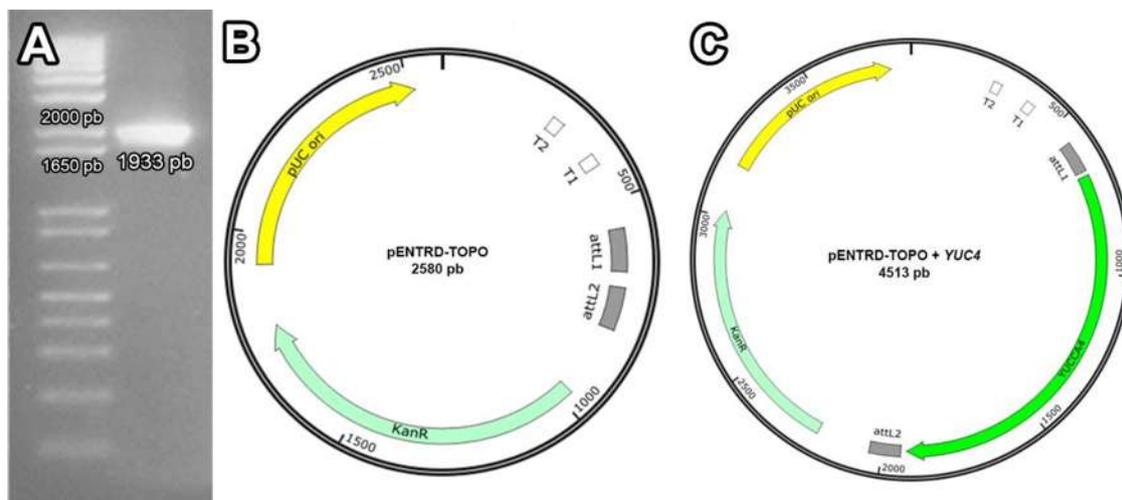


Figura 11. Clonación del gen *YUCCA4* en el vector de clonación pENTR™/D-TOPO®. (A) Producto de PCR del gen *YUC4* (1933 pb) y bandas del marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder. (B) Mapa del vector de entrada pENTR™/D-TOPO®, se esquematiza el casete de resistencia al antibiótico kanamicina (KanR), el origen de replicación (pUC ori), los terminadores de transcripción (T2 y T1) y los sitios de recombinación (attL1 y attL2). (C) Mapa del vector de entrada con el gen *YUC4* insertado.

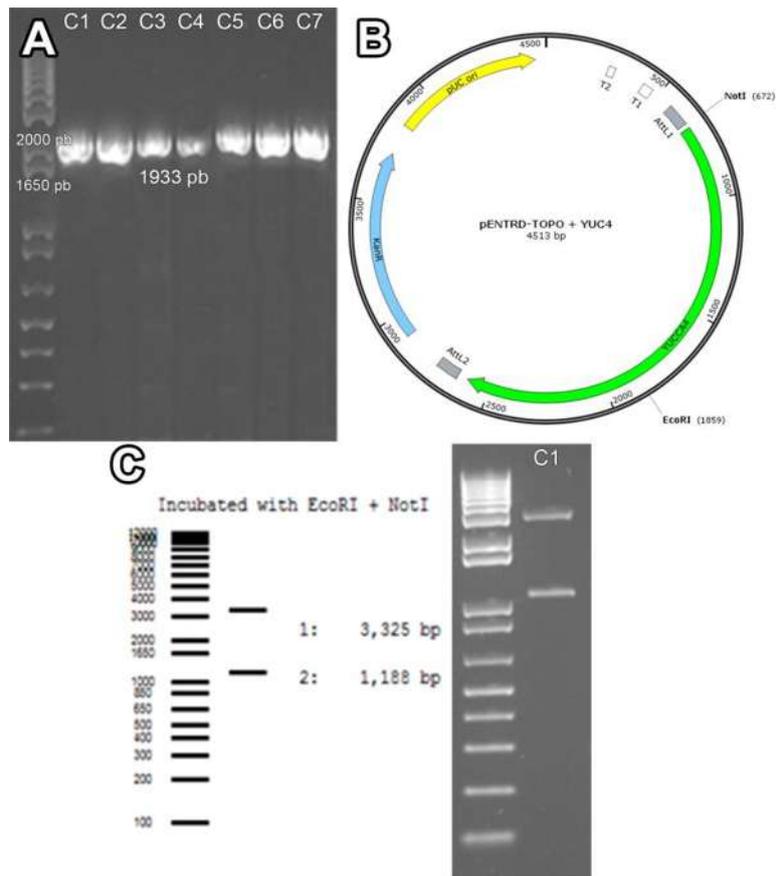


Figura 12. Comprobación de la transformación de *Escherichia coli* con el vector pENTR™/D-TOPO® clonado con *YUC4*. (A) Producto de PCR de colonia para el gen *YUC4*. Se muestran la amplificación del fragmento de 1933 pb para 7 colonias de *E. coli*. (B) Mapa del plásmido pENTR™/D-TOPO® con el gen *YUC4* que muestra los sitios de corte de restricción EcoRI y NotI. (C) Análisis de restricción para el plásmido proveniente de la colonia C1. Se muestran las bandas esperadas que corresponden a un peso 3325 y 1188 pb posterior a la digestión con las enzimas de restricción EcoRI y NotI.

7.8. Recombinación

Una vez que se corroboró que la secuencia del gen *YUCCA4* en el vector de entrada pENTR™/D-TOPO® estaba correcta, se procedió a movilizarla al vector destino pEarleyGate 100, por medio de una recombinación *in vitro*. Previamente a la recombinación, se linearizó el vector de entrada pENTR™/D-TOPO® con la enzima de restricción NruI que cortó únicamente en el gen de resistencia a kanamicina asegurándonos así que el gen no fuera funcional (Fig.

13A). El producto de la digestión se separó por medio de electroforesis y se purificó la banda correspondiente al plásmido linearizado para descartar moléculas de plásmido circular que pudieran replicarse en las bacterias. Se efectuó una reacción entre el vector de entrada linearizado y purificado con el vector destino (Fig. 13A y 13B) por medio de una LR clonasa, la cual corta, intercambia y une los sitios de recombinación del vector de entrada attL1 y attL2 con los sitios de recombinación del vector destino attR1 y attR2 de manera respectiva para formar los nuevos sitios attB1 y attB2. Por medio de esta reacción el inserto se transfiere a la región de T-DNA del vector destino pEarleyGate 100 (Fig. 13C).

El vector final posee el T-DNA delimitado por sus bordes izquierdo y derecho (RB y LB), el cual se insertará en el genoma de *Arabidopsis*; dentro del T-DNA se encuentra el gen de resistencia al herbicida BASTA que nos permitirá seleccionar las plantas transformadas y finalmente el inserto de *YUCCA4* estará bajo el control del promotor 35S del CaMV.

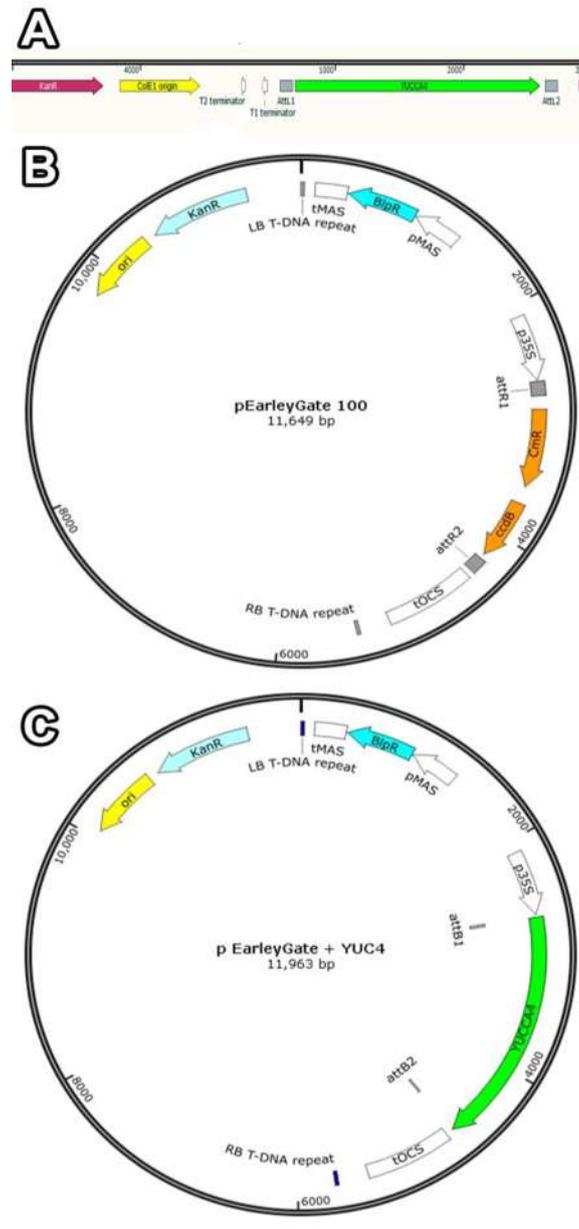


Figura 13. Recombinación del vector de entrada pENTR™/D-TOPO® con el vector pEarleyGate 100. (A) Mapa del plásmido pENTR™/D-TOPO® linearizado con la enzima NruI. (B) Mapa del vector pEarleyGate 100, se esquematiza el gen de resistencia al antibiótico kanamicina (KanR), origen de replicación (ori), el T-DNA delimitado por los verdes derecho e izquierdo (RB y LB T-DNA repeat respectivamente), el cual contiene el gen de resistencia al herbicida BASTA (*BtpR*) bajo el control de promotor (pMAS) y terminador (tMAS) de la manopina sintasa, el promotor 35S del CaMV (p35S) con terminador de la manopina sintasa (tOSC), los sitios de recombinación attR1 y attR2, el gen de resistencia a cloranfenicol (*CmR*) y el gen *ccdB* que codifica una toxina para la DNA girasa de *E. coli*. (C) Mapa del vector destino pEarleyGate 100 recombinado, ahora posee el inserto del gen *YUC4* y los sitios de recombinación attB1 y attB2.

Antes de transformar *A. tumefaciens* fue necesario comprobar la correcta recombinación *in vitro*, para dicho fin, la reacción de recombinación se utilizó para transformar la cepa DH5 α de *E. coli* por choque térmico debido a que es más sencilla de transformar y manipular que *A. tumefaciens*. A las colonias resistentes a kanamicina se les realizó un PCR para detectar la presencia del inserto (Fig. 14A) y el promotor 35S (Fig. 14B). Se consideró que las colonias que amplificaron ambas secuencias contaban con el plásmido recombinado, lo que se confirmó con un análisis de restricción (Fig. 14C y 14D). Con las reacciones antes efectuadas se corroboró que la reacción de recombinación se realizó exitosamente.

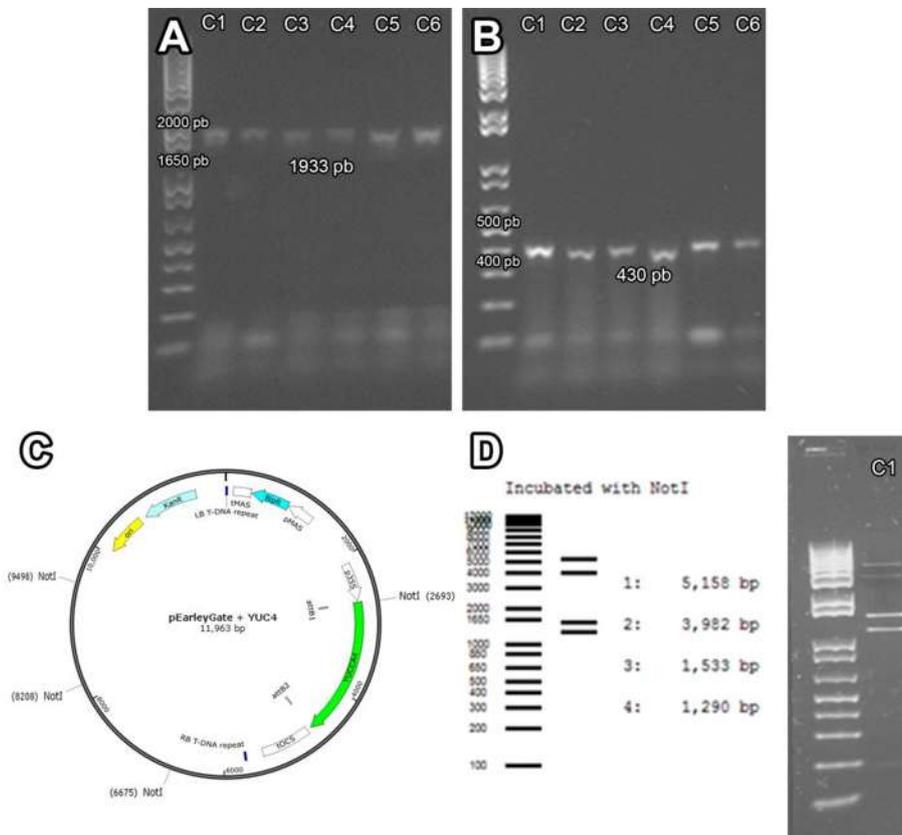


Figura 14. Comprobación de la transformación de *Escherichia coli* con el vector pEarleyGate 100 recombinado. (A) y (B) Producto de PCR de colonia para el gen *YUC4* y para el promotor 35S de 6 colonias de *E. coli* transformadas con el vector recombinado y resistentes a kanamicina. (C) Mapa del plásmido pEarleyGate 100 con el inserto *yuc4* donde se indican los sitios de corte de la enzima Not1. (D) Análisis de restricción de plásmido proveniente de la colonia 1 (C1) con Not1, se muestran bandas de 5158, 3982, 1533 y 1290 pb que suman el peso total del plásmido recombinado (11 963 pb).

7.9. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

El plásmido recombinado y purificado se utilizó para transformar células competentes de *A. tumefaciens* por medio de electroporación. Las células transformadas se sembraron en medio LB de selección (kanamicina 50 µg/ml, ampicilina 50 µg/ml y rifampicina 25 µg/ml) y se incubaron durante 48 hr a 28°C. Se seleccionaron seis colonias resistentes a las cuales se les realizó un PCR para amplificar el inserto y el promotor 35S (Fig. 15A). Únicamente la colonia C2 amplificó ambas secuencias y a partir de ella se extrajo ADN plasmídico para su análisis con enzimas de restricción. En la figura 15B se pudo observar que se obtuvo el mismo patrón que en el análisis de restricción previo en *E. coli*. Una vez corroborada la transformación de *Agrobacterium* con el plásmido de interés se procedió a transformar las plántulas de *A. thaliana*.

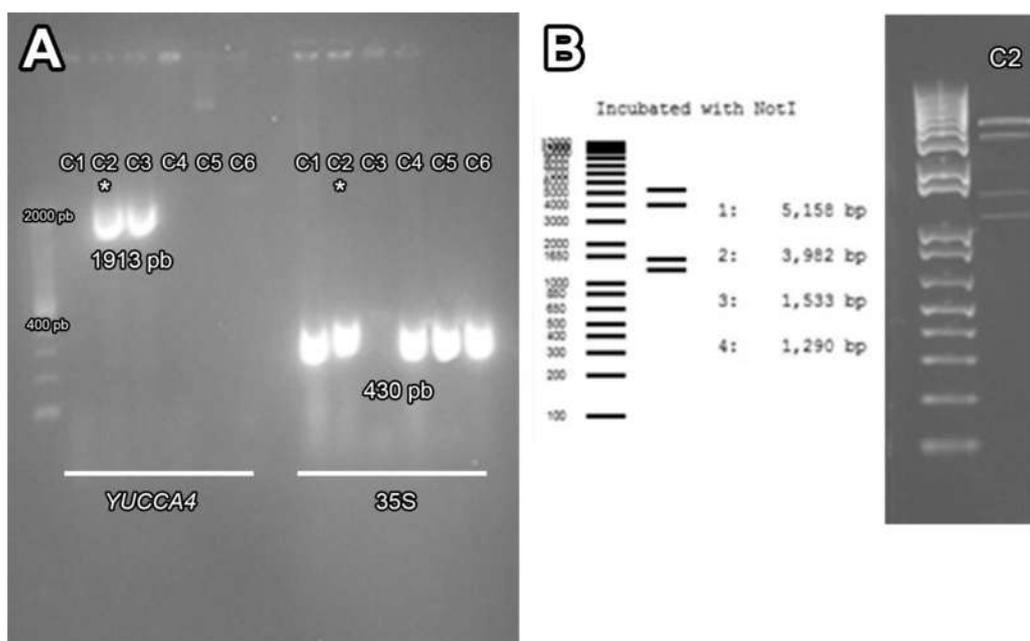


Figura 15. Comprobación de la transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con el vector pEarleyGate 100 recombinado. (A) Productos de PCR de colonia para el gen *YUCA4* y para el promotor 35S de seis colonias de *A. tumefaciens* transformadas con el vector recombinado y resistentes a kanamicina, ampicilina y rifampicina. Únicamente la colonia 2 (C2) fue positiva para ambas secuencias. (C) Análisis de restricción de plásmido proveniente de la colonia C2 con la enzima Not1, se muestra el tamaño de bandas esperado para el plásmido recombinado.

7.10. Transformación de *Arabidopsis thaliana*

La transformación de *A. thaliana* se realizó por el método “Floral dip” (Clough y Bent, 1998; Fig. 16A), muy eficiente para la transformación de *Arabidopsis*, con este método se descubrió que *A. tumefaciens* fue capaz de transformar los óvulos en *Arabidopsis* que generarán semillas transformadas (Bechtold *et al.*, 2000). En etapas tempranas del desarrollo del gineceo, *A. tumefaciens* puede introducirse al ovario, llegar a los óvulos, y expresar ahí los genes de virulencia responsables de la transferencia del T-DNA al genoma de la planta (Clough y Bent, 1998).

Posterior a los eventos de transformación, las plantas se dejaron crecer, se obtuvieron las semillas, las cuales fueron desinfectadas y sembradas en placas con medio MS suplementado con el herbicida BASTA al cual el T-DNA confiere resistencia. El principio activo del herbicida es la fosfotricina (glufosinato de amonio) un análogo del glutamato que inhibe la glutamina sintetasa, la enzima que convierte el glutamato y amoníaco en glutamina. La acumulación de amoníaco en la planta disminuye el pH en el lumen de los tilacoides provocando un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, peroxidación de lípidos, destrucción membranal y muerte de las plantas (Lea *et al.*, 1984). Las placas se colocaron en una cámara de crecimiento donde se realizó el seguimiento de las plántulas que no se vieron afectadas por el herbicida (Fig. 16B). A los 20 ddg 16 plántulas resistentes fueron trasplantadas a sustrato para crecer *A. thaliana* en suelo.

Para comprobar la transformación, se extrajo ADN genómico de tejido foliar de 9 plantas el cual se usó como molde primeramente para detectar que las plantas contaran con un elemento del T-DNA, el promotor 35S por medio de PCR (Fig. 16C). Al observar que todas las plantas analizadas lo presentaron, se consideró su transformación genética. Finalmente, se realizó la genotipificación utilizando el ADN genómico mediante una amplificación con el oligo directo del promotor 35S y el reverso de *YUCCA4*. El producto de

reacción corresponde aproximadamente a 2363 pb que equivale a la suma de ambas secuencias (Fig. 16D) con lo cual demostramos que el gen *YUCCA4* se encuentra bajo la regulación del promotor 35S del CaMV en las plantas transformadas.

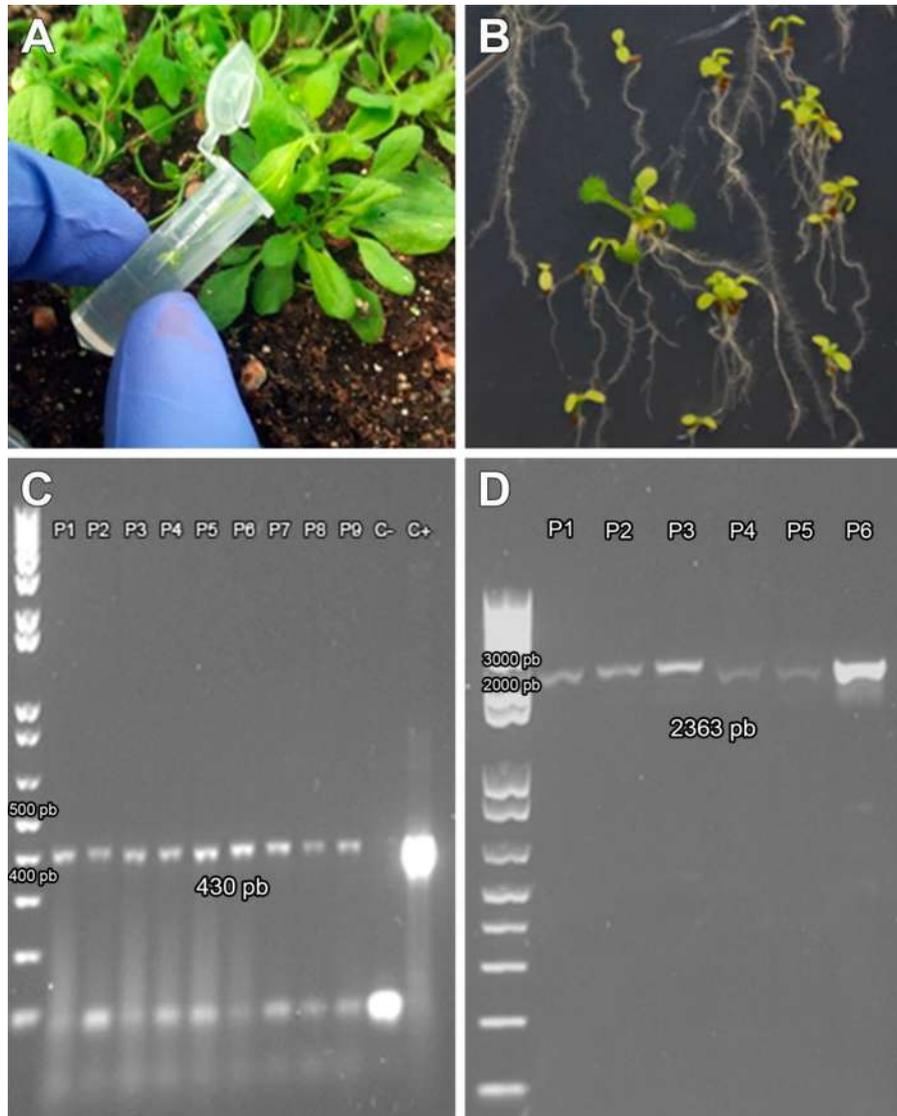


Figura 16. Transformación de *Arabidopsis thaliana*. (A) Método de transformación “floral dip” para *Arabidopsis thaliana*. (B) Selección de plantas resistentes al herbicida BASTA, 20 ddg. (C) Producto de PCR para el promotor 35S en ADN genómico de 9 plantas resistentes, el control negativo (C-) corresponde a ADN del ecotipo *Ws* y el control positivo (C+) al vector recombinado. (D) Producto de PCR para genotipificación de seis plantas resistentes, la banda corresponde un peso aproximado de 2363 pb que coincide con el peso del gen *YUC4* más el peso del promotor 35S.

7.11. Comparación fenotípica entre plántulas silvestres y la mutante **35S:YUCCA4**.

Las plantas genotipificadas con el gen *YUCCA4* bajo el control del promotor 35S se llevaron a homocigosis donde se identificaron 2 líneas que exhibieron el fenotipo anteriormente descrito para *thread/yuc4*, es decir, cotiledones epinásticos, peciolo e hipocótilo alagados, raíz primaria más larga y mayor formación de raíces laterales en comparación con el ecotipo Ws utilizado como fondo genético (Fig. 17A y B), y la mayor cantidad y longitud de pelos radiculares (Fig. 17C). Así que corroboramos que el fenotipo observado en la mutante *yuc4* corresponde a la posible sobreexpresión del gen *YUCCA4*. Las plantas transformantes **35S:YUCCA4** generadas nos servirán para futuros estudios fisiológicos, bioquímicos y moleculares asociados a la sobreexpresión del gen *YUCCA4* y a una posible sobreproducción de auxinas.

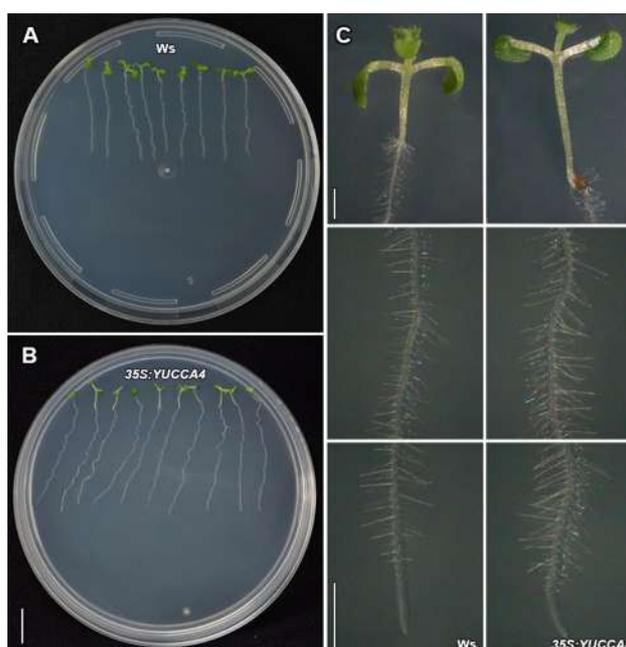


Figura 17. Comparación fenotípica entre plántulas de la línea silvestre Ws y la mutante **35S:YUCCA4.** (A) Crecimiento en placa de plántulas de ecotipo Ws y la mutante *yuc4* a los 10 ddg germinadas y crecidas en medio MS 0.2x. Barra = 1 cm. (B) Crecimiento en placa de plántulas de la línea **35S:YUCCA4** a los 10 ddg. Barra = 1 cm. (C) Imágenes representativas de tres diferentes zonas (follaje, zona media y apical de la raíz) de plántulas del ecotipo Ws y **35S:YUCCA4**, 10 ddg. Barras = 1 mm.

8. DISCUSIÓN

Las auxinas regulan una amplia variedad de procesos del crecimiento y desarrollo de las plantas, tales como la diferenciación celular, el desarrollo embrionario, la dominancia apical, respuestas trópicas, diferenciación vascular, la emergencia de raíces laterales y senescencia. Están también involucradas en las respuestas de las plantas al estrés biótico y abiótico que incluyen la sequía, alta salinidad y la infección por patógenos (Lee *et al.*, 2012).

La acción de las auxinas se regula a través de la modulación de su biosíntesis, metabolismo, transporte polar y distribución local (Benjamins y Scheres, 2008). Algunas de las enzimas y pasos en la biosíntesis del AIA han sido dilucidados con el uso de mutantes que exhiben fenotipos relacionados con alteraciones en los niveles de auxinas y por análisis del contenido endógeno de AIA y sus metabolitos (Zhao, 2010). Las monooxigenasas dependientes de flavina, denominadas colectivamente YUCCAs, han sido identificadas en varias especies de plantas, se ha descrito que estas enzimas catalizan la conversión de IPA a AIA (Zhao, 2010) y modulan la biosíntesis local de auxinas (Lee *et al.*, 2012).

En general, las mutantes caracterizadas con ganancia de función en los genes *YUCCA* muestran fenotipos similares a los observados en las mutantes sobreproductoras de auxinas, sin embargo, existen otros reportes de procesos fisiológicos en *A. thaliana* donde se involucra su sobreexpresión: Woodward y col. (2005) identificaron una mutante por “*activation tagging*” a la que denominaron *super1-D*, que suprimía la pérdida de función de la mutante *er-103* afectada en un alelo del gen *ERECTA (ER)*, que regula la arquitectura de las inflorescencias. Se sugirió que *super1-D* sobreexpresaba *YUCCA5* al identificar este gen cerca de los enhancers, para demostrarlo, el gen *YUCCA5* fue puesto bajo el promotor constitutivo 35S del CaMV (*35S:YUCCA5*) y transformado en *Arabidopsis*. Las plantas transgénicas recuperaron el fenotipo de las *super1-D* concluyendo que el incremento en la expresión de *YUCCA5* y

la consecuente sobreproducción de auxinas confería el fenotipo a *super1-D* y restauraba los defectos en las inflorescencias de *er-103* (Woodward *et al.*, 2005). La mutante *yuc6* generada por “*activation tagging*” y la transgénica 35S:*YUCCA6* muestran un retraso en la senescencia asociada con elevados niveles de auxinas y menor nivel de transcritos de genes marcadores de senescencia como *SAG12*, *NAC1* y *NAC6* (Kim *et al.*, 2011). Otra mutante generada por “*activation tagging*” *yuc7-1D* presentó notable resistencia a la sequía, fue necesario generar la línea 35S:*YUCCA7* debido a que *yuc7-1D* presentaba 3 genes bajo el control de los enhancers, con ello se demostró que la elevación de los niveles de auxinas por sobreexpresión de *YUCCA7* incrementa la resistencia a la sequía promoviendo el crecimiento de la raíz (Lee *et al.*, 2012). Las líneas transgénicas 35S:*YUC8* y 35S:*YUC9* tuvieron mayor longevidad, dominancia apical considerable y mayor expansión celular particularmente en el córtex, haces vasculares y células del parénquima provocando que el diámetro del tallo de las líneas sobreexpresoras se duplique en comparación con el ecotipo silvestre (Hentrich *et al.*, 2013a) e incluso mostraron indicios de una producción concomitante de etileno y la expresión de ambos genes podía ser inducida a través de la señalización de jasmonatos (Hentrich *et al.*, 2013b).

Además de una redundancia de función en cuanto a la biosíntesis de AIA, pareciera existir una diferencia en la función de cada miembro de la familia de genes *YUCCA* durante el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana* al ser sobreexpresados (Lee *et al.*, 2012). Sin embargo, aún no existen reportes de la importancia fisiológica de la sobreexpresión de *YUCCA4* en *A. thaliana*, por ello será interesante analizar las líneas que sobreexpresen este gen para comprobar si también estaría involucrado en algunos de los procesos mencionados e investigar en qué otros puede verse implicado.

La mutante *yucca4* generada por “*activation tagging*” mostró indicios del efecto de la ganancia de función en el gen *YUCCA4* sobre el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. *yuc4* presentó las características fenotípicas de las

mutantes sobreproductoras de auxinas que incluyen: hipocótilos y peciolo elongados, cotiledones epinásticos, incremento en la longitud en la raíz primaria con más raíces laterales (Figs. 5A y 5B) y mayor longitud y número de pelos radiculares comparada con las plántulas silvestres (Fig. 5B). Se ha demostrado actividad biosintética de AIA en el meristemo apical de la raíz (Ljung *et al.*, 2005), y que la biosíntesis local de auxinas combinada con su transporte polar está involucrada en la formación del gradiente de auxinas dentro del ápice de la raíz (Petersson *et al.*, 2009). Dicho gradiente es importante para el control de diferentes procesos en la raíz como la división, diferenciación y elongación celular en el meristemo apical, la formación de pelos radiculares y en el desarrollo de raíces laterales (Overvoorde *et al.*, 2010). Cambios en la expresión de genes *YUCCA* como el caso de *YUCCA1* y *7*, tienen un impacto en la biosíntesis de auxinas en la raíz y en el desarrollo de la misma (Stepanova *et al.*, 2011; Mashiguchi *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012), por lo tanto, *yuc4* al presentar una raíz primaria más larga con mayor número de raíces laterales y pelos radiculares comparada con la línea silvestre (Fig. 5A y 5B) muestra evidencia fenotípica de que la mutante podría presentar niveles de auxinas elevados.

La elongación celular que presenta la mutante en el hipocótilo, peciolo e incluso en pelos radiculares podría deberse a la mayor cantidad de auxinas. Se ha reportado que el hipocótilo se elonga en plantas que sobreexpresan genes de biosíntesis de auxinas y en respuesta a altas temperaturas debido al incremento en los niveles de auxinas (Gray *et al.*, 1998). Además, la mayor biosíntesis de auxinas pudiera estar causando la epinastía de las hojas (Fig. 5A y 5B) debido a que se ha reportado que los genes *YUCCA* tienen actividad en los márgenes de las hojas (Wang *et al.*, 2011). Una mayor elongación de las células de la parte adaxial de la hoja respecto a la abaxial provoca su curvatura (Keller y Van Volkenburgh, 1997), repercutiendo en la percepción de luz y por lo tanto en una fotosíntesis deficiente y afectar finalmente el desarrollo general de la mutante (Fig. 5C).

El aumento en la elongación celular que muestra la mutante *yuc4* (Fig. 6) podría ser explicada por la teoría del crecimiento ácido, la cual establece que en respuesta a las auxinas, la pared celular se acidifica en cuestión de minutos cuando el AIA se une a su receptor ABP1 que puede estar acoplado a las enzimas H⁺-ATPasas en la membrana celular y activarlas (Christian *et al.*, 2006). Las H⁺-ATPasas bombean protones a través de membranas en contra de un gradiente electroquímico, con lo cual se acidifica la región de la pared celular que activará enzimas como expansinas involucradas en la relajación y extensión de la pared. Una vez que la pared celular ha sido reblandecida, la presión osmótica provoca la entrada de agua lo que crea una presión de turgencia induciendo la elongación de la célula. Entre los 30 a 60 minutos, ocurre otra fase de elongación celular no relacionada con el proceso de acidificación, sino con la activación de genes que permiten la elongación celular por otros mecanismos como la síntesis de componentes de la pared celular (Takahashi *et al.*, 2012).

Al tener evidencias morfológicas de una mayor producción de auxinas, se decidió indagar sobre los niveles de estas hormonas usando genes reporteros (*BA3::GUS* y *HS::AXR3NT-GUS*) movilizados a la planta mutante para obtener información que permita entender la respuesta auxínica. El gen reportero *BA3::GUS* reveló que la mutante presenta niveles elevados de auxinas lo que podría correlacionar con el fenotipo de una planta sobreproductora de esta hormona (Fig. 7). En base a la intensidad y patrón de expresión diferente al control con AIA, se sugiere que la respuesta pudiera ser debida a que el reportero también pudiera responder a derivados metabólicos con actividad auxínica que presumiblemente pueden estar presentes en mayor cantidad dentro de la planta mutante regulando la homeostasis de auxinas para evitar concentraciones elevadas de AIA (Woodward y Bartel, 2005).

La línea reportera *HS::AXR3NT-GUS* indica que en la mutante *yuc4* se está llevando a cabo una constante degradación de los represores transcripcionales AUX/IAA (Fig. 8) lo que permitiría la expresión continua de los

genes de respuesta temprana a auxinas como los genes *SAUR*, *GH3* y los mismos *AUX/IAA* (Hagen y Guilfoyle, 2002). Estos últimos podrían actuar en la regulación negativa para compensar la sobreproducción del AIA y controlar así la homeostasis de auxinas. El efecto anterior provocaría el fenotipo observado que no se compara al de los cambios inducidos por una aplicación exógena de AIA. El efecto sobre el desarrollo de plántulas de *A. thaliana* tratadas con auxinas exógenas es la inhibición de la raíz primaria mientras que las mutantes conocidas de *A. thaliana* que sobreproducen auxinas exhiben hipocótilos alargados esta respuesta diferencial quizás sea debida a alteraciones en el transporte polar de auxinas (Gray *et al.*, 1998).

El NPA es un compuesto que afecta el transporte polar de auxinas, actúa a nivel de tráfico vesicular impidiendo que los transportadores de eflujo PIN se incorporen a la membrana plasmática (Nishimura *et al.*, 2012). La disminución del transporte de auxinas por acción del NPA normaliza el crecimiento del hipocótilo en la mutante *yuc4* (Fig. 9). Debido a que se sabe que las auxinas regulan a sus transportadores a nivel transcripcional (Vieten *et al.* 2005) y que además controlan el tráfico vesicular importante para su establecimiento en la membrana (Paciorek *et al.* 2005), es importante conocer más a fondo el mecanismo por el cual la sobreproducción de auxinas puede afectar el transporte de las mismas.

Las citocininas juegan un papel fundamental en la morfogénesis de las plantas, se ha reportado que en ciertos procesos actúan de manera sinérgica con las auxinas como en el caso del establecimiento de la población celular en el meristemo apical del tallo, o bien, antagónicamente en la organización y mantenimiento de la población celular del meristemo apical de la raíz y de igual forma en la emergencia de yemas axilares contrarrestando la dominancia apical (Durbak *et al.*, 2012). Por otra parte, se ha reportado que el tratamiento con auxinas puede inhibir la biosíntesis de citocininas (Nordström *et al.*, 2004) o bien, la sobreproducción de citocininas causa niveles disminuidos de AIA libre y reducción en las tasa de biosíntesis del AIA en tabaco (Eklöf *et al.*, 2000). Para

indagar si la mayor producción de auxinas en la mutante *yuc4* podría alterar la expresión de genes de respuesta a citocininas, se analizó la actividad del reportero *ARR5::GUS* movilizado a la mutante *yuc4*. *ARR5* es uno de los genes *ARR* del tipo A (regulador negativo de la señalización de citocininas) que es regulado transcripcionalmente por estas hormonas, la construcción posee el gen de la β -glucoronidasa bajo el promotor del gen *ARR5* y brinda información acerca de la respuesta a citocininas (D'Agostino *et al.*, 2000). El ensayo mostró que no hubo cambios significativos en la expresión del reportero en la mutante *yuc4* respecto a las plántulas control (Fig. 10), lo que sugiere que la señalización de la citocininas a través del sistema de dos componentes no pareciera verse afectada y por lo tanto no participa en los cambios fenotípicos de la mutante. Sin embargo, aún no se descarta la posibilidad que la mayor respuesta a auxinas en la mutante esté afectando la señalización de las citocininas actuando indirectamente sobre otros componentes como pueden ser los receptores, otros reguladores negativos, los reguladores positivos o repercutiendo en la biosíntesis de citocininas. Existen mecanismos usados por estas hormonas para llevar a cabo una interacción a través de la homeostasis, percepción o señalización, sin embargo el problema que enfrentan los estudios de las interacciones auxinas-citocininas es la dificultad de resolver la causa y efecto de cada fenómeno de interacción observado a un nivel específico y en cada aspecto del desarrollo de la planta, tanto en los casos de mutantes con sobreproducción constitutiva o con menor síntesis de estas hormonas (Nordström *et al.*, 2004).

La herramienta primaria para evaluar la función de un gen, es el escrutinio de mutaciones con pérdida de función que dan como resultado la reducción de la expresión o la desaparición de la proteína para la cual codifica o bien, la disminución de su actividad. Sin embargo, una limitación de estos escrutinios es que rara vez identifican genes que actúan redundantemente, el problema de la redundancia funcional se hace cada vez más evidente con la secuenciación del genoma de eucariontes. Una segunda clase de genes cuya función es difícil de identificar por pérdida de función son aquellos cuya

ausencia resulta en letalidad. El problema del estudio de esta clase de genes se ha resuelto con ayuda de las mutantes condicionales, donde la mutación únicamente se expresa bajo estímulos o condiciones específicas (Bouché y Bouchez, 2001). Otra estrategia para abordar el estudio de este tipo de genes, es el uso de mutaciones con ganancia de función. Los fenotipos por ganancia de función pueden ser causados cuando la región codificante del gen sufre cambios, dando como resultado que la proteína que produce tenga mayor actividad o sea más estable que la silvestre o por modificaciones que incrementan el nivel o patrón espacio-temporal de la expresión del gen o lo extienden a nuevos dominios (Weigel *et al.*, 2000).

Una estrategia para producir mutaciones con ganancia de función debida al incremento en la expresión de genes, es el uso de agentes insercionales modificados (T-DNA o transposones) en los cuales se introducen amplificadores de la expresión génica que pueden causar activación transcripcional de genes cercanos (Marsch-Martínez *et al.*, 2009). Ejemplo de ello, es la tecnología desarrollada por Walden y col. (Hayashi *et al.*, 1992), quienes construyeron un vector de T-DNA que contiene cuatro copias clonadas en tándem de secuencias de un elemento potenciador (enhancer) proveniente del promotor constitutivamente activo del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Debido a que los genes activados estarán asociados con la inserción de T-DNA este enfoque es conocido como “*activation tagging*”. Los potenciadores o enhancers son regiones de ADN que aumentan los niveles de transcripción de los genes, actúan en *cis* pero independientemente a su posición y orientación respecto al gen que regulan, ya que han sido identificados inclusive a varios miles de pares de bases río arriba o río abajo del sitio de inicio de la transcripción del gen regulado. En las células eucariotas, la estructura de la cromatina está dispuesta de tal forma que a pesar de que el potenciador se encuentre lejos del gen en cuanto a número de nucleótidos, está geoméricamente cercano al promotor (Weigel *et al.*, 2000). Los enhancers no actúan sobre las regiones promotoras por sí mismos, sino que se unen a activadores transcripcionales que interactúan con el complejo mediador que

recluta a la polimerasa II y a factores de transcripción para llevar a cabo la transcripción de los genes (Arnosti y Kulkarni, 2005).

La estrategia de “*activation tagging*” aumenta únicamente el patrón de expresión nativa de los genes y pareciera solamente activar a un grupo de genes debido a cierta selectividad promotor específica de los enhancers o potenciadores que pareciera depender de la posición de los elementos núcleo en el promotor como son la caja TATA y el motivo DPE (Butler y Kadonaga, 2001). Además, la actividad de los potenciadores puede verse afectada por la presencia de secuencias llamadas aisladores (“insulator”) que protegen a los genes de los efectos de potenciadores o silenciadores adyacentes organizando la cromatina en dominios funcionalmente independientes previniendo su acción sobre los promotores (West *et al.*, 2002). Por lo tanto, esta estrategia tiene bajas posibilidades de poder identificar cada gen con potencial de sobreexpresarse y sus fenotipos. También se ha reportado que la mayoría de los genes activados no están inmediatamente adyacentes a los potenciadores y que varios genes pueden verse regulados al mismo tiempo. Para descartar estos inconvenientes y verificar que el fenotipo observado por la activación de un gen corresponde también a su expresión ectópica constitutiva, dicho gen se coloca bajo el control del promotor 35S del CaMV completo. Se sugiere entonces que el enfoque de ganancia de función utilizando al promotor 35S del CaMV adyacente al gen en cuestión es un complemento para la estrategia de “*activation tagging*” (Weigel *et al.*, 2000).

Se procedió entonces a transformar *Arabidopsis thaliana* con el gen *YUCCA4* bajo el control del promotor 35S del CaMV. Las mutantes *35S:YUCCA4* generadas (Fig. 17) permitieron comprobar que el fenotipo coincide con el observado en la mutante *yuc4*. Por lo tanto estas últimas mutantes serán objeto de futuros estudios fisiológicos, bioquímicos y moleculares que permitirán obtener información más confiable sobre la participación de la sobreexpresión del gen en diferentes procesos asociados a su sobreexpresión, como la sobreproducción de auxinas y la regulación de la

homeostasis de la hormona en el desarrollo de *A. thaliana*. Con esto se expandiría el entendimiento acerca de la biosíntesis, transporte, almacenamiento, degradación y señalización de las auxinas, lo que podría llevar al desarrollo de estrategias para manipular la actividad de esta hormona con precisión espacial y temporal que incluso podría permitir obtener herramientas para mejorar ciertas características agronómicas en las plantas.

9. CONCLUSIONES

YUCCA4 participa en procesos de elongación celular y la regulación del desarrollo mediante un posible aumento de los niveles de auxinas. Lo anterior derivaría en el incremento de respuesta auxínica implicando la degradación del represor AXR3 y en un mayor transporte de esta hormona, lo cual no pareciera estar enlazado a la respuesta a citocininas.

Las plantas transgénicas *35S:YUCCA4* generadas presentan el fenotipo de las mutantes sobreproductoras de auxinas, su análisis permitirá dilucidar de manera más específica la función del gen *YUCCA4* en el desarrollo vegetal y en la biosíntesis de auxinas.

10. PERSPECTIVAS

- 1.-Comprobar la sobreexpresión del gen *YUCCA4* en las líneas transformantes seleccionadas.
- 2.-Caracterizar las líneas *35:YUCCA4* a nivel genético, fisiológico y bioquímico.

11. LITERATURA CITADA

Arnosti D. y Kulkarni M. (2005). Transcriptional enhancers: intelligent enhanceosomes or flexible billboards?. *J. Cell. Biochem.*94: 890-898.

Barbez E., Kubeš M., Rolčík J., Béziat C., Pěňčík A., Wang B., Rosquete M., Zhu J., Dobrev P., Lee Y., Zažímalová E., Petrášek J., Geisler M., Friml J. y Kleine-Vehn J. (2012). A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants. *Nature* 485: 119-122.

Bechtold N., Jaudeau B., Jolivet S., Maba B., Vezon D., Voisin R. y Pelletier G. (2000). The maternal chromosome set is the target of the T-DNA in the in planta transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 155: 1875-1887.

Benjamins R. y Scheres B. (2008). Auxin: the looping star in plant development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 443-465.

Birnboim H. y Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.

Bouché N. y Bouchez D. (2001). *Arabidopsis* gene knockout: phenotypes wanted. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 111-117.

Böttcher C., Burbidge C., Boss P. y Davies C. (2013), Interactions between ethylene and auxin are crucial to the control of grape (*Vitis vinifera* L.) berry ripening. *BMC Plant Biol.* 13: 222.

Bowman J. (1994). *Arabidopsis: an atlas of morphology and development.* Ed. Springer-Verlag. pp 450.

Butler J. y Kadonaga J. (2001) Enhancer-promoter specificity mediated by DPE or TATA core promoter motifs. *Genes & Dev.* 15: 2515-2519.

Calderón-Villalobos L., Lee S., De Oliveira C., Ivetac A., Brandt W., Armitage L., Sheard L., Tan X., Parry G., Mao H., Zheng N., Napier R., Kepinski S. y Estelle M. (2012). A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nat. Chem. Biol.* 8: 477-485.

Cheng Y., Dai X. y Zhao Y. (2006). Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 20: 1790-1799.

Cheng Y. y Zhao Y. (2007). A role for auxin in flower development. *J. Integr. Plant Biol.* 49: 99-104.

Ciesielski T. (1872) Untersuchungen über die Abwärtskrümmung der Wurzel. *Beitr. Biol. Pflanzen.* 1: 1-30.

Clough S. y Bent A. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 735-743.

Cohen J. y Bandurski R. (1982). Chemistry and physiology of the bound auxins. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33: 403-430.

Christian M., Steffens B., Schenck D., Burmester S., Böttger M. y Lüthen H. (2006). How does auxin enhance cell elongation? Roles of auxin-binding proteins and potassium channels in growth control. *Plant Biol.* 8: 346-352.

Dai X., Mashiguchi K., Chen Q., Kasahara H., Kamiya Y., Ojha, S., DuBois J., Ballou D. y Zhao Y. (2013). The biochemical mechanism of auxin biosynthesis by an *Arabidopsis* YUCCA flavin-containing monooxygenase. *J. Biol. Chem.* 288: 1448-1457.

Darwin C. y Darwin F. (1881). The power of movement in plants. Appleton and Company.

de Vos M., Kriksunov K. y Jander G. (2008). Indole-3-acetonitrile production from indole glucosinolates deters oviposition by *Pieris rapae*. *Plant Physiol.* 146: 916-926.

Di Fiore S., Li Q., Leech M., Schuster F., Emans N., Fischer R. y Schillberg S. (2002). Targeting tryptophan decarboxylase to selected subcellular compartments of tobacco plants affects enzyme stability and in vivo function and leads to a lesion-mimic phenotype. *Plant Physiol.* 129: 1160-1169.

Durbak A., Yao H. y McSteen P. (2012). Hormone signaling in plant development. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15: 92-96.

Epstein E., Cohen J. y Slovin J. (2002). The biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid changes during tomato fruit development. *Plant Growth Regul.* 38: 15-20.

Eklöf S., Åstot C., Sitbon F., Moritz T., Olsson O. y Sandberg G. (2000). Transgenic tobacco plants co-expressing *Agrobacterium* *iaa* and *ipt* genes have wild-type hormone levels but display both auxin- and cytokinin-overproducing phenotypes. *Plant J.* 23: 279–284.

Expósito-Rodríguez M., Borges A., Borges-Pérez A. y Pérez J. (2011). Gene structure and spatiotemporal expression profile of tomato genes encoding YUCCA-like flavin monooxygenases: the ToFZY gene family. *Plant Physiol Bioch.* 49: 782-791.

Gallavotti A., Barazesh S., Malcomber S., Hall D., Jackson D., Schmidt R. y McSteen P. (2008). *sparse inflorescence1* encodes a monocot-specific YUCCA-like gene required for vegetative and reproductive development in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 15196-15201.

Gray M., Ostin A., Sandberg G., Romano C. y Estelle M. (1998). High temperature promotes auxin-mediated hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 7197-7202.

Gray W. (2004). Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS Biol.* 2: e311.

Gray W., Kepinski S., Rouse D., Leyser O. y Estelle M. (2001). Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 414: 271-276.

Guilfoyle T. y Hagen G. (2007). Auxin response factors. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10: 453-60.

Hayashi H., Czaja I., Lubenow H., Schell J. y Walden R. (1992) Activation of a plant gene by T-DNA tagging: auxin-independent growth *in vitro*. *Science* 258: 1350-1353.

Hagen G. y Guilfoyle T. (2002). Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol. Biol.* 49: 373-385.

Hentrich M., Böttcher C., Düchting P., Cheng Y., Zhao Y., Berkowitz O., Masle J., Medina J. y Pollmann S. (2013). The jasmonic acid signaling pathway is linked to auxin homeostasis through the modulation of *YUCCA8* and *YUCCA9* gene expression. *Plant J.* 74: 626-637.

Hentrich M., Sánchez-Parra B., Pérez M., Carrasco V., Carrillo L., Carbajosa J., Medina J. y Pollmann S. (2013). *YUCCA8* and *YUCCA9* overexpression reveals a link between auxin signaling and lignification through the induction of ethylene biosynthesis. *Plant Signal. Behav.* 8: p.e26363.

Jackson R., Lim E., Li Y., Kowalczyk M., Sandberg G., Hoggett J., Ashford D. y Bowles D. (2001). Identification and biochemical characterization of an *Arabidopsis* indole-3-acetic acid glucosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 276: 4350-4356.

Keller C. y Van Volkenburgh E. (1997). Auxin-induced epinasty of tobacco leaf tissues. A non-ethylene mediated response. *Plant Physiol.* 113: 604-610.

Kim J., Murphy A., Baek D., Lee S., Yun D., Bressan R. y Narasimhan M. (2011). *YUCCA6* over-expression demonstrates auxin function in delaying leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 62: 3981-3992.

Kögl F. y Smit A. (1931). Über die Chemie des Wuchsstoffs. *Proc. Kon. Akad. Wetensch.* 34: 1411-1416.

Kowalczyk M. y Sandberg G. (2001). Quantitative analysis of indole-3-acetic acid metabolites in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127: 1845-1853.

Krueger S. y Williams D. (2005) Mammalian flavin-containing monooxygenases: structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism. *Pharmacol. Theor.* 106: 357-387.

Lea P., Joy K., Ramos J. y Guerrero M. (1984). The action of 2-amino-4-(methylphosphonyl)-butanoic acid (phosphinothricin) and its 2-oxo-derivative on the metabolism of cyanobacteria and higher plants. *Phytochemistry* 23: 1-6.

LeClere S., Tellez R., Rampey R., Matsuda S. y Bartel B. (2002). Characterization of a family of IAA-amino acid conjugate hydrolases from *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 277: 20446-20452.

Lee M., Jung J., Han D., Seo P., Park W. y Park C. (2011) Activation of a flavin monooxygenase gene YUCCA7 enhances drought resistance in *Arabidopsis*. *Planta* 235: 923-938.

Lehmann T., Hoffmann M., Hentrich M., Pollmann S. y Lehmann T. (2010) Indole-3-acetamide-dependent auxin biosynthesis: a widely distributed way of indole-3-acetic acid production? *Eur. J. Cell Biol.* 89: 895-905.

Liu, H., Ying, Y.Y., Zhang, L., Gao, Q.H., Li, J., Zhang, Z., Fang J. y Duan K. (2012). Isolation and characterization of two YUCCA flavin monooxygenase genes from cultivated strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Plant Cell Rep.* 31: 1425-1435.

Ljung K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* 140: 943-50.

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

Ljung K., Hull A., Celenza J., Yamada M., Estelle M., Normanly J. y Sandberg G. (2005). Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell.* 17:1090-1104.

Malamy J. y Benfey P. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 28: 67-77.

Marsch-Martinez N., Greco R., Van Arkel G., Herrera-Estrella L. y Pereira A. (2002). Activation tagging using the En-I maize transposon system in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129: 1544-1556.

Marsch-Martínez N., Zúñiga-Mayo V., Reyes-Olalde J., Salazar-Moya O. y de Folter S. (2009) Genómica funcional de plantas: estudio del desarrollo de flores y frutos. *Acta Universitaria*. 19: 21-29.

Mashiguchi K., Tanaka K., Sakai T., Sugawara S., Kawaide H., Natsume M. Hanada A., Yaeno T., Shirasu K., Yao H., McSteen P., Zhao Y., Hayashi K., Kamiya Y. y Kasahara H. (2011). The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108: 18512-18517.

Meinke D., Cherry J., Dean C., Rounsley S. y Koornneef M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* 282: 662-682.

Meyerowitz E. y Pruitt R. (1985). *Arabidopsis thaliana* and Plant Molecular Genetics. *Science* 229: 1214-1218.

Mikkelsen M., Fuller V., Hansen B., Nafisi M., Olsen C., Nielsen H. y Halkier B. (2009) Controlled indole-3-acetaldoxime production through ethanol-induced expression of CYP79B2. *Planta* 229: 1209-1217.

Mockaitis K. y Estelle M. (2008). Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24: 55-80.

Murashige T. y Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15: 473-497.

Nafisi M., Goregaoker S., Botanga C., Glawischnig E., Olsen C., Halkier B. y Glazebrook J. (2007). *Arabidopsis* cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime in camalexin synthesis. *Plant Cell.* 19: 2039-2052.

Nishimura T., Matano N., Morishima T., Kakinuma C., Hayashi K., Komano T., Kubo M., Hasebe M., Kasahara H., Kamiya Y. y Koshiba T. (2012). Identification of IAA transport inhibitors including compounds affecting cellular PIN trafficking by two chemical screening approaches using maize coleoptile systems. *Plant Cell Physiol.* 53: 1671-1682.

Novák O., Hénykova E., Sairanen I., Kowalczyk M., Pospíšil T. y Ljung K. (2012). Tissue-specific profiling of the *Arabidopsis thaliana* auxin metabolome. *Plant J.* 72: 523-536.

Nordström A., Tarkowski P., Tarkowska D., Norbaek R., Åstot C., Dolezal K., y Sandberg G. (2004). Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 8039–8044.

Oono Y., Chen Q., Overvoorde P., Köhler C. y Theologis A. (1998). age Mutants of *Arabidopsis* exhibit altered auxin-regulated gene expression. *Plant Cell* 10: 1649-1662.

Östin A., Kowalyczk M., Bhalerao R. y Sandberg G. (1998). Metabolism of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 118: 285-296.

Ouyang J., Shao X. y Li J. (2000). Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 24: 327–334.

Overvoorde P., Fukaki H. y Beeckman T. (2010) Auxin control of root development. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2: a001537.

Paciorek T., Zazimalová E., Ruthardt N., Petrásek J., Stierhof Y., Kleine-Vehn J., Morris D., Emans N., Jürgens G., Geldner N. y Friml J. (2005). Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature*. 435: 1251-1256.

Petersson S., Johansson A., Kowalczyk K., Makoveychuk A., Wang J., Moritz T., Grebe M., Benfey P., Sandberg G. y Ljung K. (2009). An auxin gradient and maximum in the *Arabidopsis* root apex shown by high-resolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis. *Plant Cell*. 21: 1659-1668.

Pelagio-Flores R., Ortíz-Castro R., Méndez-Bravo A., Macías-Rodríguez L. y López-Bucio J. (2011). Serotonin, a tryptophan-derived signal conserved in plants and animals, regulates root system architecture probably acting as a natural auxin inhibitor in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. 52: 490-508.

Rampey R., LeClere S., Kowalczyk M., Ljung K., Sandberg G. y Bartel B. (2004). A family of auxin-conjugate hydrolases that contributes to free indole-3-acetic acid levels during *Arabidopsis* germination. *Plant Physiol*. 135: 978-988.

Rapparini F., Tam Y., Cohen J. y Slovin J. (2002). Indole3-acetic acid metabolism in *Lemna gibba* undergoes dynamic changes in response to growth temperature. *Plant Physiol*. 128: 1410-1416.

Ribnicky D., Cohen J., Hu W. y Cooke T. (2002). An auxin surge following fertilization in carrots: a mechanism for regulating plant totipotency. *Planta* 214: 505-509.

Ross J., Tivendale N., Reid J., Davies N., Molesworth P., Lowe E., Smith J. y Davidson S. (2011). Reassessing the role of YUCCAs in auxin biosynthesis. *Plant Signal Behav*. 6: 437-439.

Sairanen I., Novák O., Pencík A., Ikeda Y., Jones B., Sandberg G. y Ljung K. (2012). Soluble carbohydrates regulate auxin biosynthesis via PIF proteins in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24: 4907-4916.

Santner A. y Estelle M. (2009). Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature* 459: 1071-1078.

Sauer M. y Kleine-Vehn J. (2011). AUXIN BINDING PROTEIN1: the outsider. *Plant Cell* 23: 2033-2043.

Schlaich N. (2007). Flavin-containing monooxygenases in plants: looking beyond detox. *Trends Plant Sci.* 12: 412-418.

Shtratnikova, V. y Kulaeva, O. (2008). Cytokinin-dependent expression of the ARR5::GUS construct during transgenic *Arabidopsis* growth. *Russ J Plant Physiol.* 55: 756-764.

Spaepen S. y Vanderleyden J. (2010) Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3: a001438.

Staswick P., Serban B., Rowe M., Tiryaki I., Maldonado M., Maldonado M. y Suza W. (2005). Characterization of an *Arabidopsis* enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell.* 17: 616–627.

Stepanova N., Yun J., Robles M., Novak O., He W., Guo, H., Ljung K. y Alonso J. (2011). The *Arabidopsis* YUCCA1 flavin monooxygenase functions in the indole-3-pyruvic acid branch of auxin biosynthesis. *Plant Cell.* 23: 3961-3973.

Sugawara S., Hishiyama S., Jikumaru Y., Hanada A., Nishimura T., Koshiba T., Zhao Y., Kamiya Y. y Kasaharaa H. (2009). Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106: 5430-5435.

Swarup R., Parry G., Graham N., Allen T. y Bennett M. (2002). Auxin cross-talk: integration of signalling pathways to control plant development. *Plant Mol Biol.* 49: 411-426.

Szemenyei H., Hannon M. y Long J. (2008). TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during *Arabidopsis* embryogenesis. *Science* 319: 1384-1386.

Sztein A., Cohen J. y Cooke T. (2002). Indole-3-acetic acid biosynthesis in isolated axes from germinating bean seeds: The effect of wounding on the biosynthetic pathway. *Plant Growth Regul.* 36: 201-207.

Sztein A., Cohen J., de la Fuente I. y Cooke T. (1999). Auxin metabolism in mosses and liverworts. *Am. J. Bot.* 86: 1544-1555.

Takahashi K., Hayashi K. y Kinoshita T. (2012). Auxin Activates the Plasma Membrane H⁺-ATPase by Phosphorylation during Hypocotyl Elongation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 159: 632-641.

Tam Y., Epstein E. y Normanly J. (2000). Characterization of auxin conjugates in *Arabidopsis*. Low steady-state levels of indole-3-acetylaspartate, indole-3-acetyl-glutamate, and indole-3-acetyl-glucose. *Plant Physiol.* 123: 589-595.

Teale W., Paponov I. y Palme K. (2006). Auxin in action: Signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 847-859.

Thomson K., Hertel R. y Miller S. (1973). 1-N-naphthylphthalamic acid and 2,3,5-triiodobenzoic acid: in-vitro binding to particulate cell fractions and action on auxin transport in corn coleoptiles. *Planta* 109: 337-52.

Tivendale N., Davies N., Molesworth P., Davidson S., Smith J., Lowe E., Reid J. y Ross J. (2010). Reassessing the role of N-hydroxytryptamine in auxin biosynthesis. *Plant Physiol.* 154: 1957-1965.

Tivendale N., Ross J. y Cohen J. (2013). The shifting paradigms of auxin biosynthesis. *Trends Plant Sci.* 19: 44-51.

Tobeña-Santamaria R., Bliet M., Ljung K., Sandberg G., Mol J., Souer E. y Koes R. (2002). FLOOZY of petunia is a flavin mono-oxygenase-like protein required for the specification of leaf and flower architecture. *Genes Dev.* 16: 753-763.

Ulmasov T., Murfett J., Hagen G. y Guilfoyle T. (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell.* 9: 1963-1971.

Vieten A., Vanneste S., Wisniewska J., Benková E., Benjamins R., Beeckman T., Luschnig C. y Friml J. (2005). Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* 32: 4521-4531.

Vorwerk S., Biernacki S., Hillebrand H., Janzik I., Muller A., Weiler E. y Piotrowski M. (2001). Enzymatic characterization of the recombinant *Arabidopsis thaliana* nitrilase subfamily encoded by the NIT2/NIT1/NIT3-gene cluster. *Planta* 212: 508-516.

Wang W., Xu B., Wang H., Li J., Huang H. y Xu L. (2011). YUCCA genes are expressed in response to leaf adaxial-abaxial juxtaposition and are required for leaf margin development. *Plant Physiol.*157: 1805-1819.

Weigel D., Ahn J., Blazquez M., Borevitz J., Christensen S., Fankhauser C., Ferrandiz C., Kardailsky I., Malancharuvil E., Neff M., Nguyen J., Sato S., Wang Z., Xia Y., Dixon R., Harrison M., Lamb C., Yanofsky M. y Chory J. (2000). Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*122: 1003-1013.

Weissbach H., King W., Sjoerdsma A. y Udenfriend S. (1959). Formation of indole-3-acetic acid and tryptamine in animals: a method for estimation of indole-3-acetic acid in tissues. *J. Biol. Chem.* 234: 81-86.

West A., Gaszner M. y Felsenfeld G. (2002). Insulators: many functions, many mechanisms. *Genes & Dev.* 16: 271-288.

Weyers J. y Patterson N. (2001) Plant hormones and the control of physiological processes. *New Phytol.* 152: 375-407.

Won C., Shen X., Mashiguchi K., Zheng Z., Dai X., Cheng Y., Kasahara H., Kamiya Y., Chory J. y Zhao Y. (2011). Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASES OF ARABIDOPSIS and YUCCAs in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108: 18518-18523.

Woodward A y Bartel B. (2005). Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Ann. Bot.* 95: 707-735

Woodward C., Bemis S., Hill E., Sawa S., Koshiba T. y Torii K. (2005) Interaction of auxin and ERECTA in elaborating *Arabidopsis* inflorescence architecture revealed by the activation tagging of a new member of the YUCCA family putative flavin monooxygenases. *Plant Physiol.* 139: 192-203.

Yamamoto Y., Kamiya N., Morinaka Y., Matsuoka M. y Sazuka T. (2007). Auxin biosynthesis by the *YUCCA* genes in rice. *Plant Physiol.* 143: 1362-1371.

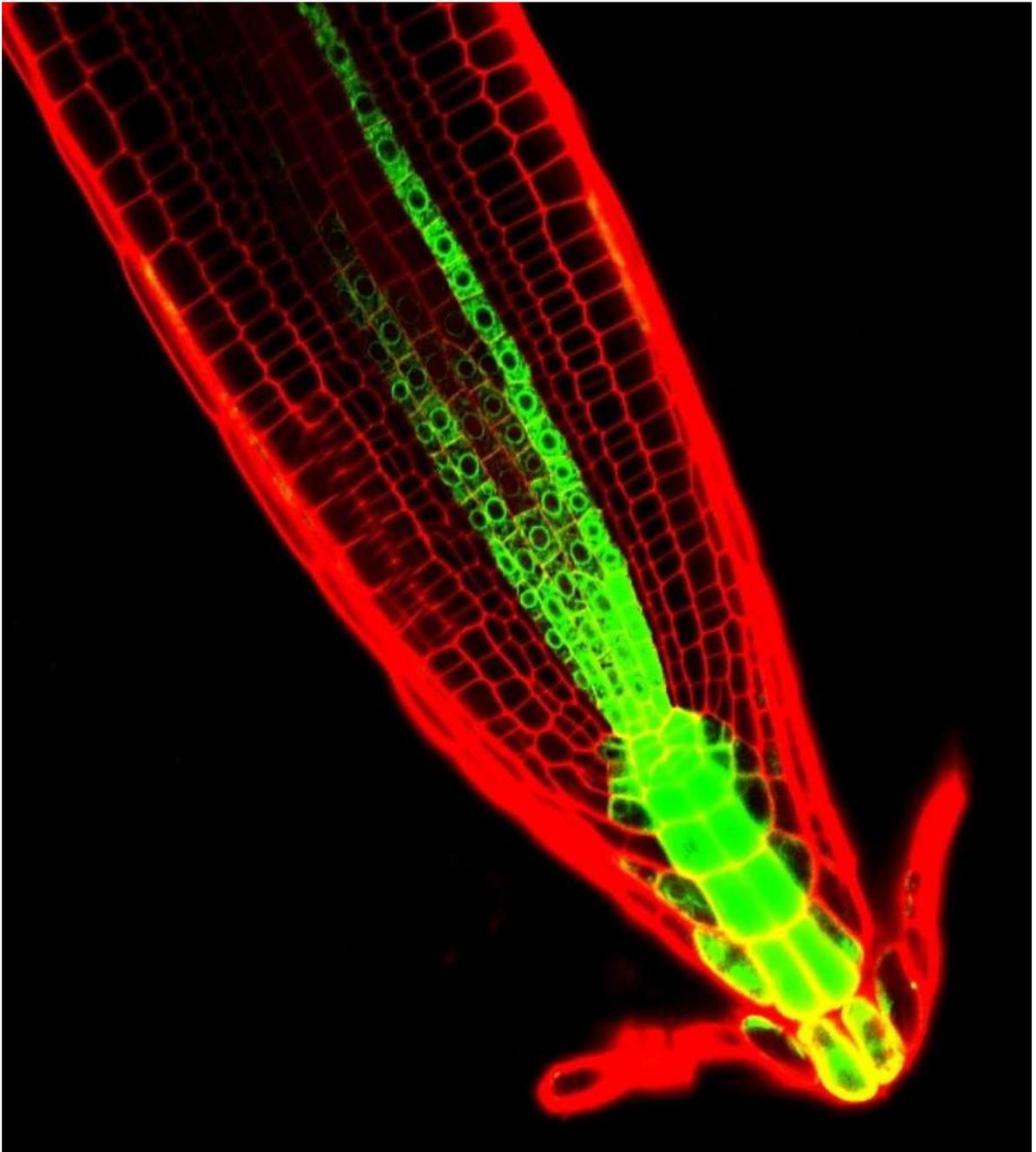
Yang Y., Xu R., Ma C., Vlot A., Klessigand D. y Pichersky E. (2008). Inactive Methyl Indole-3-Acetic Acid Ester Can Be Hydrolyzed and Activated by Several Esterases Belonging to the AtMES Esterase Family of *Arabidopsis*. *Plant. Physiol.* 147: 1034-1045.

Zhao Y. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 49-64.

Zhao Y., Christensen S., Fankhauser C., Cashman J., Cohen J., Weigel D. y Chory J. (2001). A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science* 291: 306-309.

Zhou Z., Zhang G., Wu L., Zhang G., Chai J., Wang M., Jha A., Jia P., Cui J., Yang M., Chen R. y Guo G. (2011). Functional characterization of the CKRC1/TAA1 gene and dissection of hormonal actions in the *Arabidopsis* root. *Plant J.* 66: 516-527.

ANEXO I. Biosíntesis y metabolismo de Auxinas (Capítulo 1. Libro fronteras en la bioquímica y desarrollo de plantas. Beltrán-Peña E. y López-Bucio J. eds. 2013. ISBN: 978-607-424-392-5)



CAPÍTULO 1

Biosíntesis y metabolismo de auxinas

Biosíntesis y metabolismo de auxinas

Aarón G. Munguía-Rodríguez, Randy Ortiz-Castro, José López-Bucio y Elda Beltrán-Peña

Las auxinas, representadas principalmente por el ácido indol-3-acético (AIA), están implicadas en la regulación del crecimiento y desarrollo vegetal. Para la biosíntesis del AIA en plantas se han propuesto dos vías, una que utiliza al triptófano (Trp) como precursor y una independiente de este aminoácido. En la biosíntesis del AIA a partir de Trp se ha postulado la existencia de al menos cuatro intermediarios: (I) indol-3-acetamida (IAM); (II) ácido indol-3-pirúvico (IPA); (III) triptamina (TAM) y (IV) indol-3-acetaldoxima (IAOX). A pesar de que diferentes especies de plantas pueden tener estrategias adaptativas conservadas para optimizar su metabolismo y de que las auxinas son integradores de señales ambientales para modular la expresión genética, la información respecto a la biosíntesis del AIA no ha sido completamente dilucidada. Ha sido hasta recientemente, que los genes clave para este proceso se han empezado a conocer. En este capítulo se abordan y discuten los tópicos sobre el metabolismo y biosíntesis del AIA, considerando los últimos hallazgos desde la biología molecular, la bioquímica y la bioinformática.

1.1. Introducción

La forma y función de los organismos multicelulares ocurre por la comunicación eficiente entre células, tejidos y órganos. En las angiospermas, la regulación y coordinación del metabolismo, el crecimiento y la morfogénesis dependen de señales químicas que se transmiten de una parte de la planta a otra.

El estudio de las auxinas, que data desde las observaciones de Charles Darwin sobre los efectos de una sustancia hipotética que modulaba el alargamiento del brote de la planta para permitirle un crecimiento trófico hacia la luz, demostró la existencia de una sustancia difusible con actividad sobre el crecimiento (Darwin, 1880). El término auxina fue acuñado por científicos que examinaban en la orina humana, sustancias moduladoras del crecimiento vegetal a las que denominaron como auxinas A y B (Kögl y Smit, 1931). Posteriormente, un compuesto aislado de hongos estructuralmente distinto pero con actividad auxínica fue llamado heteroauxina, el estudio de las auxinas A y B fue gradualmente abandonado debido a la mejor bioactividad de la heteroauxina, la cual, más tarde se determinó que se trataba del ácido indol-3-acético (AIA), la principal auxina encontrada en la naturaleza presente en hongos, algas, animales y principalmente en las plantas (Weissbach *et al.*, 1959). Se han descrito varias moléculas con actividad auxínica presentes en las plantas y algunos compuestos sintéticos pueden mimetizar los efectos de las auxinas naturales (Fig. 1.1).

La biosíntesis de AIA ocurre en hojas, cotiledones y raíces, siendo las hojas jóvenes y los meristemos de las raíces los que acumulan mayor cantidad de AIA (Ljung *et al.*, 2001). Aunque está comprobado que las plantas utilizan varias vías para sintetizar AIA, ninguna de ellas se ha definido al grado de conocer cada gen, enzimas e intermediarios participantes. Las múltiples vías de biosíntesis del AIA contribuyen a la regulación de su producción dentro de la planta, pero debido a que las mutaciones con pérdida de función de las enzimas de dichas rutas resultaron en fenotipos letales y aunado esto, a la redundancia funcional, se ha visto limitado el análisis del control de las vías, lo que ha impedido una determinación definitiva de la importancia de cada una de ellas (Woodward y Bartel, 2005).

1.2. Biosíntesis del AIA

Las vías biosintéticas del AIA (Fig. 1.2) se clasifican como Trp-dependiente, si dicha auxina proviene

directamente del Trp o como Trp-independiente si el AIA se obtiene a partir de un precursor indólico del Trp (Woodward y Bartel, 2005). Estudios de marcaje con isótopos, realizados en una gran variedad de especies de plantas, han demostrado la existencia de ambas vías de síntesis y su participación en diferentes procesos del desarrollo vegetal (Ljung *et al.*, 2002), incluyendo la embriogénesis (Ribnicky *et al.*, 2002), la maduración del fruto (Epstein *et al.*, 2002), la respuesta a cambios de temperatura (Rapparini *et al.*, 2002), la germinación y el crecimiento temprano de las plántulas (Ljung *et al.*, 2001) y la respuesta a heridas (Sztejn *et al.*, 2002).

Décadas de investigación en plantas han establecido que existen múltiples intermediarios durante la biosíntesis de AIA Trp-dependientes: (I) indol-3-acetamida (IAM); (II) ácido indol-3-pirívico (IPA); (III) triptamina (TAM) y (IV) indol-3-acetaldoxíma (IAOX) (Woodward y Bartel, 2005; Pollmann *et al.*, 2006; Chandler, 2009; Mano *et al.*, 2010; Normanly, 2010; Zhao, 2010) (Fig. 1.2). Si bien existen las rutas microbianas de biosíntesis del AIA, ninguna de ellas ha sido completamente dilucidada y se sabe poco de las enzimas clave involucradas, tampoco está definido si todos los intermediarios existen en cada una de las especies vegetales (Fig. 1.2). A pesar de ello, recientemente se han realizado avances considerables en cuanto a la identificación de los genes involucrados en la biosíntesis del AIA y su función en plantas.

1.3. La ruta de la indol-3-acetamida (IAM)

Al principio se pensó que la biosíntesis del AIA a través del IAM era una vía específica de las bacterias, debido a la falta de evidencia de esta vía en plantas. El fitopatógeno *Agrobacterium rhizogenes* posee un plásmido denominado Ri inductor de raíces, causando una enfermedad que se caracteriza por la proliferación de raíces en el sitio de la infección (Moore *et al.*, 1979). En dichas raíces, el AIA se sintetiza a partir de Trp por una reacción de dos pasos, como resultado de la expresión de los genes *aux1* (también conocido como *iaaM/tms1*) y *aux2* (*iaaH/tms2*) presentes en el plásmido Ri (Gaudin *et al.*, 1993). La ruta biosintética de auxinas catalizada por los productos génicos de *aux1* y *aux2* es similar en *Agrobacterium tumefaciens* y *Pseudomonas syringae* (Comai y Kosuge, 1982; Schroder *et al.*, 1984; Thomashow *et al.*, 1984; Yamada *et al.*, 1985; Camilleri y Jouanin, 1991). El Trp se convierte primero

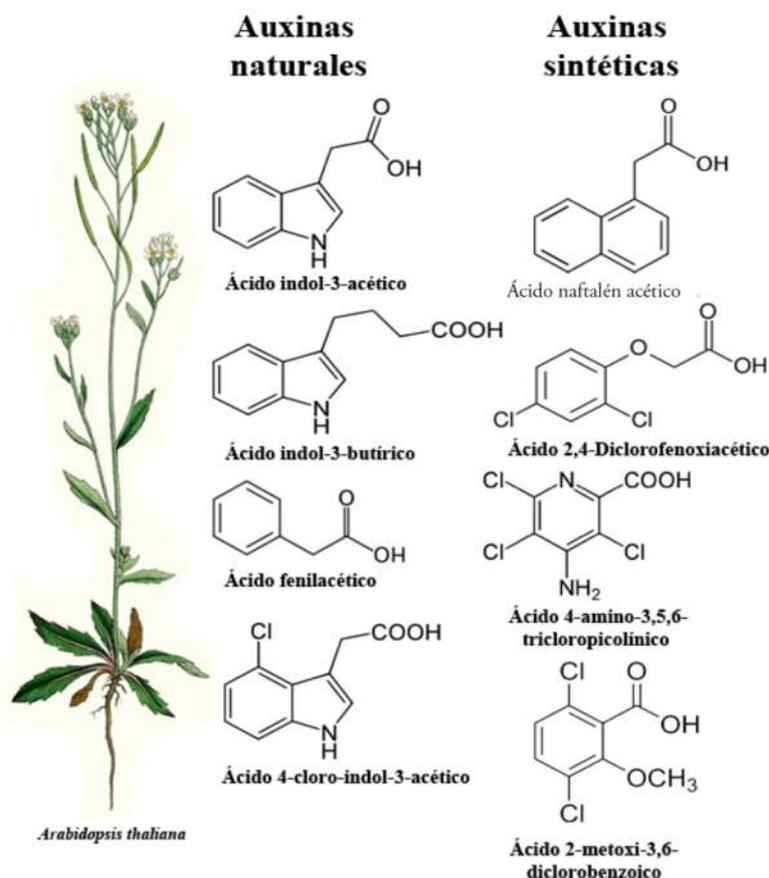


Figura 1.1. *Arabidopsis thaliana*, el modelo biológico de plantas y las moléculas con actividad auxínica de origen natural y sintético (Modificado de Bowman, 1994).

en IAM por la enzima triptófano-2-monooxigenasa codificada por el gen *aux1/iaaM/tms1* (Gaudin *et al.*, 1993) (Fig. 1.2). Entonces, la IAM se transforma en AIA por acción de la indol-3-acetamida hidrolasa codificada por el gen *aux2/iaaH/tms2* (Gaudin *et al.*, 1993; Mano *et al.*, 2010). Experimentos utilizando la proteína verde fluorescente (GFP) confirmaron que estas enzimas se localizan en el citoplasma de la célula vegetal (Pollmann *et al.*, 2006). Se ha encontrado que el IAM es un compuesto presente de manera natural y que la ruta IAM para la biosíntesis de AIA es ubicua en monocotiledóneas o dicotiledóneas (Pollmann *et al.*, 2009). Análisis bioinformáticos también sugieren que esta ruta está ampliamente distribuida en el reino vegetal (Mano *et al.*, 2010).

1.4. La ruta del ácido indol-3-pirúvico (IPA)

El gen *TAA1* (TRIPTOFANO-AMINO-TRANSFERASA de ARABIDOPSIS 1), que codifica una aminotransferasa que convierte el Trp en IPA (Fig. 1.2), fue aislado por dos grupos de investigación diferentes, los cuales caracterizaban mutantes defectuosas en evitar la sombra (Tao *et al.*, 2008) y en las respuestas a etileno (Stepanova *et al.*, 2008). Los investigadores observaron que las mutaciones en *TAA1* conducían a una reducción dramática en los niveles del AIA, lo que sugería la existencia de una ruta de biosíntesis dependiente del IPA. Otros hallazgos indicaron que *TAA1* se requiere para el aumento rápido de los niveles de auxina a través de la biosíntesis *de novo* del AIA cuando la planta se expone a la sombra (Tao *et al.*, 2008).

La sobreexpresión de *TAA1* bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), no mostró fenotipos sobreproductores de auxinas, lo que sugiere que *TAA1* no es una enzima limitante en la biosíntesis de la auxina (Tao *et al.*, 2008). Además, se confirmó mediante experimentos con líneas transgénicas sobreexpresoras de *TAA1* fusionadas a proteínas amarillo fluorescente (YFP) y proteína verde fluorescente (GFP), que *TAA1* se encuentra en el citoplasma de las células vegetales (Stepanova *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2008).

Análisis genómicos en *A. thaliana* revelaron que *TAA1* es idéntico al gen *TIR2* (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 2) y que es uno de los cinco miembros de una familia de genes: *TAA1/TIR2* y *TAR1-TAR4*. Sin embargo, la proteína *TAA1/TIR2* no contiene la extensión N-terminal que le brinda a las demás una señal de localización en la vacuola sugiriendo así una función diferente a la de *TAR2-TAR4* (Stepanova *et al.*, 2008).

En las bacterias, se han reportado dos vías para la biosíntesis de AIA que usan IAM (Trp → IAM → AIA) y el IPA (Trp → IPA → AID → AIA) como intermediarios. La mayoría de los fitopatógenos, tales como *A. rhizogenes*, *A. tumefaciens* y *P. syringae* utilizan la vía de IAM como se ha descrito anteriormente (Casanova *et al.*, 2005). Mientras que la vía del IPA se encuentra en las especies de rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas donde se incluye a *Azospirillum brasilense*, *Enterobacter cloacae* y *Pseudomonas putida* (Patten y Glick, 2002).

En la vía bacteriana del IPA, el Trp se convierte en IPA por la acción de una Trp aminotransferasa, el cual posteriormente se transforma en indol-3-acetaldehído (IAD) por la indol-3-piruvato descarboxilasa. El AIA se produce por la oxidación del IAD, mediante una indol-3-acetaldehído oxidasa. Sin embargo, se desconoce si el IPA se convierte en IAD en las plantas, ya que ni el gen ni la enzima han sido aislados (Mano y Nemoto, 2012) (Fig. 1.2).

1.5. La vía de la triptamina (TAM)

La triptófano descarboxilasa (TDC) es una enzima citosólica que convierte el Trp en TAM, el cual es un protoalcaloide presente en etapas tempranas de la ruta biosintética de los alcaloides indolterpenoides (Di Fiore *et al.*, 2002.). La TDC está bien caracterizada a nivel molecular y bioquímico,

y se encuentra ampliamente distribuida dentro del reino vegetal (Mano y Nemoto, 2012). Los genes *TDC* han sido funcionalmente caracterizados por participar en la biosíntesis de alcaloides indólicos y la serotonina (5-hidroxitriptamina), un neurotransmisor en mamíferos y molécula ampliamente distribuida en las plantas (Pelagio-Flores *et al.*, 2011), además se ha propuesto a la ruta de TAM como otra de las vías biosintéticas del AIA (Fig. 1.2).

El gen *YUCCA* codifica una monooxigenasa dependiente de flavina, enzima que en *A. thaliana* transforma la TAM a *N*-hidroxitriptamina (Zhao *et al.*, 2001). Genes ortólogos de *YUCCA* se han encontrado en otras plantas incluyendo la petunia (*FZY*) (Tobeña-Santamaría *et al.*, 2002), arroz (*OsYUCCA1-OsYUCCA7*) (Yamamoto *et al.*, 2007), maíz (*SPI1*) (Gallavotti *et al.*, 2008), chicharo (*PsYUC*) (Tivendale *et al.*, 2010) y tomate (*TbFZY*) (Expósito-Rodríguez *et al.*, 2011).

Estudios filogenéticos muestran que las proteínas *YUCCA* de *Arabidopsis* pertenecen a un grupo de monooxigenasas dependientes de flavina que incluye a once miembros (*YUC1-YUC11*) con función redundante, por lo cual, su estudio se ha realizado con ayuda de mutantes con ganancia de función que sobreexpresan estos genes (Cheng *et al.*, 2006, 2007, Zhao *et al.*, 2001) (Fig. 1.3).

Las enzimas de *Arabidopsis* *AtYUC1* y *AtYUC6*, del tomate *ToFZY1* y *ZmYUC* del maíz catalizan la conversión de TAM a la *N*-hidroxitriptamina (Zhao *et al.*, 2001, LeClere *et al.*, 2010, Expósito-Rodríguez *et al.*, 2011). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que *YUC* no puede catalizar la conversión de la TAM a la *N*-hidroxitriptamina (Tivendale *et al.*, 2010; Ross *et al.*, 2011). Debido a que existen inconsistencias importantes en los resultados de los productos de reacción obtenidos de los espectros de masas, las conclusiones de Zhao *et al.* (2001), que se basaban en ensayos *in vitro* seguidos de análisis por espectrometría de masas o por HPLC, deben ser confirmadas (Tivendale *et al.*, 2010). Zhao (2010) ha afirmado que se necesitan investigaciones adicionales para determinar si la TAM es el sustrato *in vivo* para *YUC* debido a que se sabe que las monooxigenasas dependientes de flavina tienen amplias especificidades de sustratos *in vitro*, es por ello que en la actualidad no existe evidencia suficiente para considerar a la *N*-hidroxitriptamina como intermediario en la biosíntesis del AIA. Las proteínas *YUCCA*, así como la ruta de la TAM podrían participar en la conversión de IPA a AIA (Mashiguchi *et al.*, 2011).

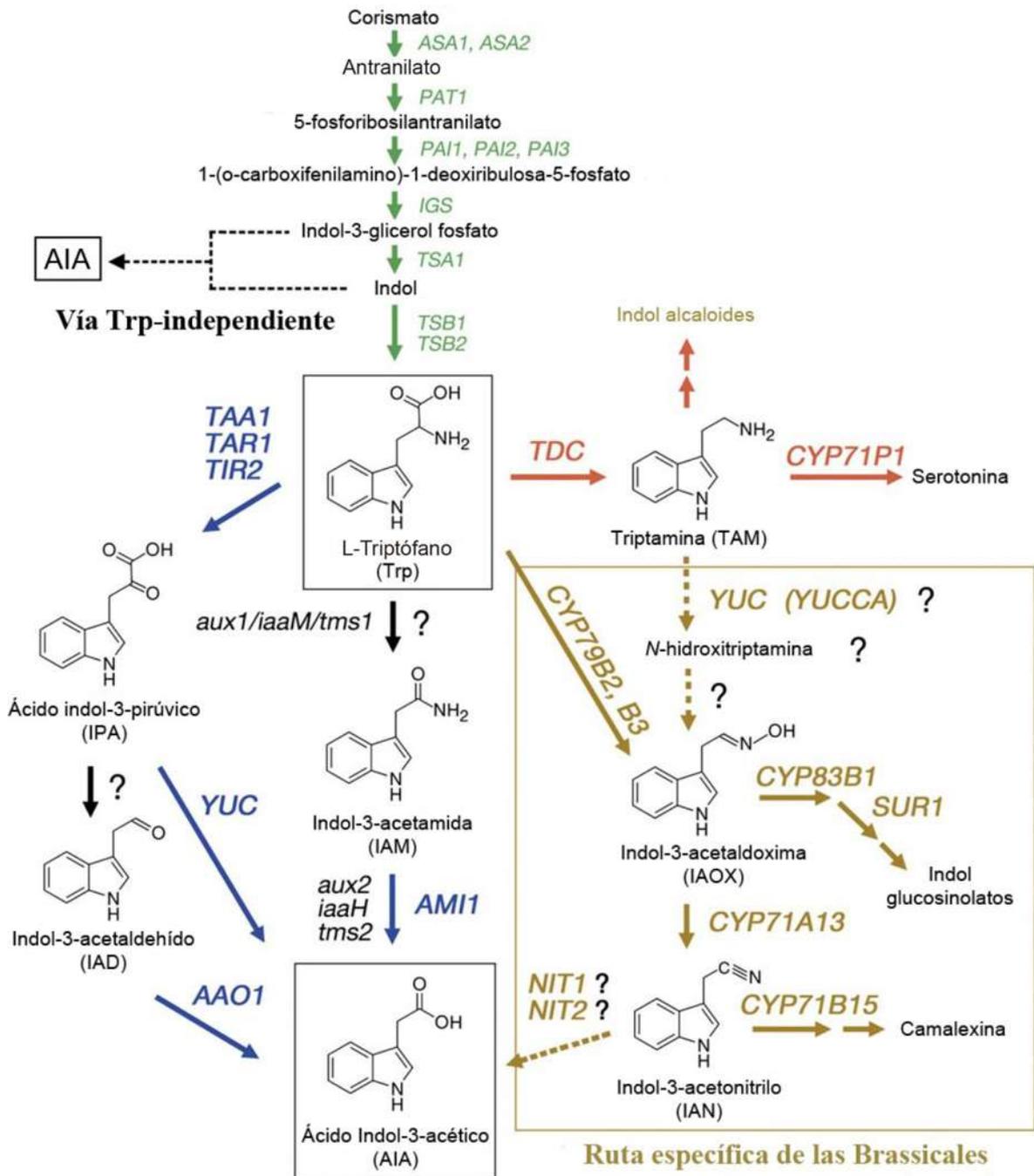


Figura 1.2. Probables rutas implicadas en la biosíntesis del AIA en las plantas. Las flechas verdes indican la vía de síntesis de triptófano en cloroplasto. Una flecha negra discontinua denota la vía triptófano-independiente. Las flechas azules indican los eventos en donde se conoce el gen y la función enzimática dentro de la vía biosintética Trp-dependiente. Las flechas rojas indican las rutas de biosíntesis de indol alcaloides y serotonina. Las flechas color mostaza, muestran una ruta específica para la familia Brassicaceae. Flechas punteadas de color mostaza indican los pasos cuyos genes y función enzimática son poco entendidos. Las flechas negras indican los pasos donde el o los genes y la función enzimática son desconocidos. Letras en cursiva muestran los genes implicados en procesos de conversión. Las letras minúsculas en cursiva indican genes bacterianos (Modificado de Mano y Nemoto, 2012).

1.6. La ruta de la indol-3-acetaldoxima (IAOX)

La IAOX se sintetiza a partir del Trp por la acción de dos enzimas homólogas al citocromo P450: CYP79B2 y CYP79B3, que contienen un péptido de tránsito al cloroplasto en su extremo N-terminal (Fig. 1.2). La participación de estas enzimas en la formación de la IAOX se ha demostrado en *Arabidopsis* (Hull *et al.*, 2000; Mikkelsen *et al.*, 2000) y en *Brassica* (Ludwig-Müller y Hilgenberg, 1988).

La familia de genes *CYP79B* se ha identificado en *Arabidopsis*, *Brassica napus* y *Sinapis alba* (Bak *et al.*, 1998). Análisis filogenéticos muestran que la familia de proteínas *CYP79B* se limita sólo a las especies de la familia Brassicaceae indicando que la ruta de biosíntesis de AIA dependiente de la IAOX no es común en las plantas. Por otra parte, la IAOX es conocida por ser un intermediario en la síntesis de metabolitos secundarios de las plantas, tales como indol glucosinolatos, camalexina e indol-3-acetonitrilo (IAN) en especies Brassicáceas incluyendo *Arabidopsis* (de Vos *et al.*, 2008; Mikkelsen *et al.*, 2009) (Fig. 1.2).

El IAN también ha sido propuesto como un intermediario en la biosíntesis del AIA, se ha mostrado

que la enzima CYP71A13 cataliza la conversión de IAOX a IAN en Brassicáceas, que se convierte posteriormente en camalexina por el citocromo P450 CYP71B15 (Nafisi *et al.*, 2007).

Se ha sugerido que las plantas convierten el IAN al AIA por medio de nitrilasas y en *Arabidopsis* se han identificado cuatro genes codificantes de estas enzimas (*AtNIT1-AtRNIT4*) (Fig. 1.2). Se cree que los productos de *AtNIT1*, 2, y 3 participan en la conversión de IAN en AIA (Bartling *et al.*, 1992, 1994; Bartel y Fink, 1994; Hillebrand *et al.*, 1998). Sin embargo, se ha encontrado que estas tres nitrilasas tienen mayor afinidad por otras moléculas nitriladas (Vorwerk *et al.*, 2001) y que la hidrólisis de IAN por estas enzimas *in vitro* es ineficiente, por tanto, los mecanismos exactos por los cuales se convierte IAOX en AIA siguen sin esclarecerse por completo.

1.7. Almacenamiento del AIA: conjugados y ácido indol-3-butírico

El nivel de disposición del AIA para mediar una respuesta biológica de la célula en un momento dado

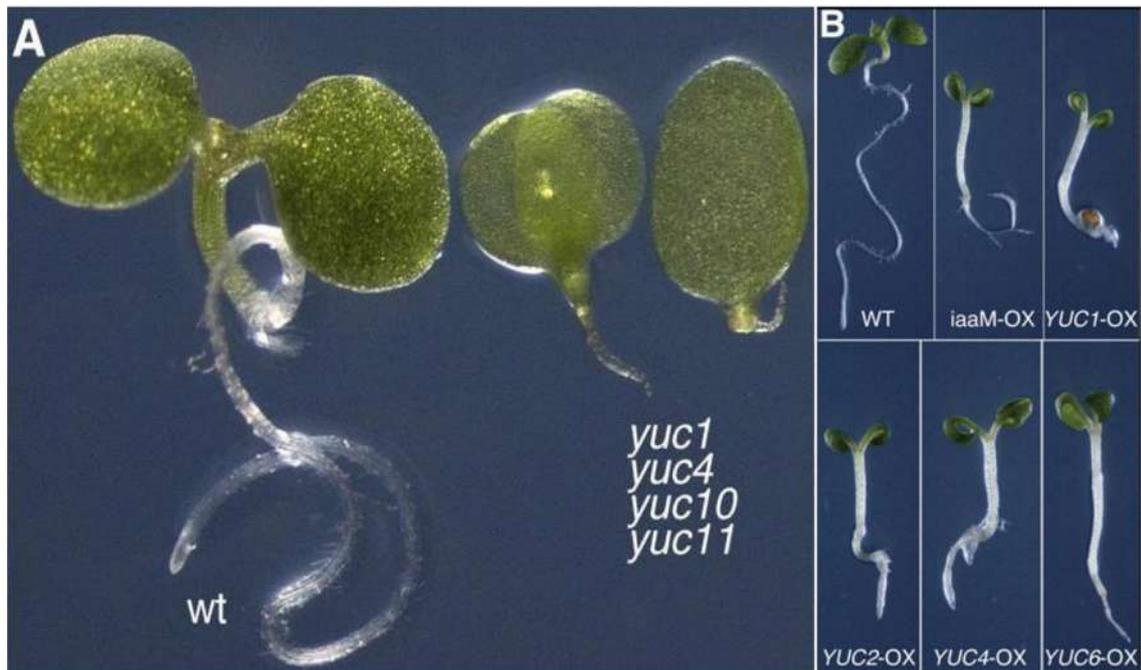


Figura 1.3. Fenotipos de plántulas de *A. thaliana* mutantes en los genes *YUC*. (A) Comparación fenotípica entre el ecotipo y mutantes con pérdida de función en los genes *YUC1*, *YUC4*, *YUC10* y *YUC11* (Tomado de Cheng *et al.*, 2007). (B) Comparación fenotípica entre el ecotipo y mutantes sobreexpresoras de los genes *YUC1*, *YUC2*, *YUC4*, *YUC6* y el gen bacteriano *iaaM* (Tomado de Cheng *et al.*, 2006).

está regulado por una serie de factores: biosíntesis, conjugación, transporte y degradación (Fig. 1.4).

La biosíntesis *de novo* no es la única fuente del AIA libre, las plantas superiores pueden almacenar al AIA en forma de conjugados y de ácido indol-3-butírico (IBA), los cuales pueden proporcionar AIA libre por hidrólisis o β -oxidación, respectivamente (Fig. 1.5). El AIA puede unirse a azúcares por medio de enlaces éster o a aminoácidos y péptidos a través de enlaces amida. Las funciones propuestas para estos conjugados incluyen el almacenamiento, transporte, compartimentación, e inactivación del AIA (Cohen y Bandurski, 1982). Algunos conjugados del AIA poseen actividad auxínica y varias plantas almacenan AIA conjugado en las semillas para ser hidrolizados durante la germinación y proporcionar AIA libre necesario en el desarrollo del embrión. En contraste, los conjugados biológicamente inactivos presentes en las plantas son probablemente intermediarios de la degradación del AIA (Woodward y Bartel, 2005). Las diferentes especies vegetales tienen distintos perfiles del AIA conjugado, pero en ocasiones entre diferentes especies pueden aparecer perfiles similares, lo que sugiere funciones ancestrales de los conjugados dentro de las plantas (Sztein *et al.*, 1999).

Experimentos utilizando hidrólisis alcalina para liberar AIA de conjugados indican que *A. thaliana* mantiene aproximadamente el 90% del AIA en enlaces amida, un 10% como conjugados con enlaces éster y cerca del 1% como AIA libre (Normanly *et al.*, 1993; Tam *et al.*, 2000). Niveles bajos de AIA-Ala, AIA-Asp, AIA-Glu y AIA-Leu están presentes en semillas y plántulas de *A. thaliana* (Kowalczyk y Sandberg, 2001; Rampey *et al.*, 2004).

Los conjugados tienen diferentes actividades *in planta*: AIA-Ala y el AIA-Leu inhiben la elongación de las raíces y son sustratos de las amidohidrolasas en *A. thaliana* (Leclere *et al.*, 2002; Campanella *et al.*, 2003; Rampey *et al.*, 2004). El AIA-Ala está presente en niveles más altos en los brotes, mientras que AIA-Leu se acumula en las raíces (Kowalczyk y Sandberg, 2001), pero ningún conjugado se forma a niveles detectables después de la aplicación del AIA a las plántulas o las hojas (Östín *et al.*, 1998). Estos resultados sugieren que la función de AIA-Ala y AIA-Leu es suministrar AIA libre. En contraste, los conjugados AIA-Asp y AIA Glu no son apreciablemente hidrolizados y son ineficientes en la inhibición de la elongación de las raíces. Los tejidos como las hojas en crecimiento y las raíces contienen los niveles más altos de AIA libre

así como de AIA-Asp y AIA-Glu, lo que sugiere un papel catabólico para estos conjugados (Kowalczyk y Sandberg, 2001).

El ácido indol-3-butírico (IBA) es otra auxina natural presente en una gran variedad de plantas. Las condiciones que cambian los niveles del AIA tienden a alterar de manera similar los niveles del IBA (Epstein y Ludwig-Müller, 1993) lo que sugiere que ambos metabolismos están vinculados; incluso, plántulas de *A. thaliana* tratadas con AIA marcado sintetizaron IBA marcado, sugiriendo así, que el IBA se sintetiza a partir del AIA (Ludwig-Müller y Epstein, 1994). Debido a que el IBA también actúa como un precursor del AIA, éste podría funcionar de manera similar a los conjugados bioactivos del AIA (Bartel *et al.*, 2001).

Mutantes con defectos específicos en la β -oxidación son IBA resistentes, sugiriendo que este último se convierte en AIA mediante un proceso paralelo a la β -oxidación de los ácidos grasos, la cual en plantas se lleva a cabo exclusivamente en los peroxisomas (Kindl, 1993). Como varias mutantes en respuesta al IBA tienen defectos peroxisomales, se establece que la conversión de IBA a AIA ocurre en los peroxisomas. De igual forma que el AIA, gran parte del IBA en las plantas se conjuga a través de enlaces amida y ésteres (Ludwig-Müller, 2000).

1.8. Inactivación del AIA

Las vías que inactivan al AIA (Fig. 1.5) contrarrestan su ingreso a las reservas, los conjugados de AIA que se acumulan después de la exposición de *Arabidopsis* al AIA aparentemente difieren de los utilizados para el almacenamiento del AIA. En *Arabidopsis*

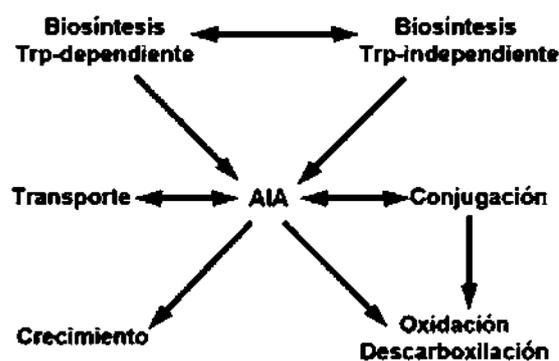


Figura 1.4. Factores que afectan los niveles del AIA en plantas (Normanly *et al.*, 2012).

continuamente se inactiva el AIA a través de la oxidación del anillo indólico (oxAIA) (Fig. 1.5), el cual puede ser luego conjugado a hexosa (Östin *et al.*, 1998). Además, el AIA se conjuga con Asp y Glu al aplicar 5 μ M de AIA y con Asp, Glu, Gln y glucosa en respuesta a 500 μ M de la auxina (Barrat *et al.*, 1999). En respuesta a niveles elevados del AIA, las vías catabólicas de conjugación pueden ser sobre reguladas y las de conjugación para el almacenamiento disminuídas. Por ejemplo, el fenotipo sobreproductor de auxinas de la mutante *yucca* es suprimido por la expresión de *iaaL*, una enzima microbiana que conjuga AIA, lo que sugiere que la conjugación del AIA es insuficiente en *yucca* para mitigar esa sobreproducción (Zhao *et al.*, 2001).

Las enzimas que conjugan AIA a los aminoácidos son codificadas por los miembros de la familia de genes *GH3* inducidos por auxinas, estas enzimas están relacionadas con la enzima JAR1 que conjuga al ácido jasmónico con la isoleucina (Staswick y Tiryaki, 2004). Las enzimas GH3 aparentemente prefieren sintetizar

las formas inactivas (AIA-Asp y AIA-Glu) sobre los conjugados hidrolizables (AIA-Ala y AIA-Leu) *in vitro* (Staswick *et al.*, 2005).

En plantas, además de los conjugados con aminoácidos, también se encuentran los conjugados esterificados AIA-glucosa y se han identificado proteínas con actividad de AIA glucosiltransferasa que pudieran conjugar el IBA con la glucosa.

Una enzima que metila la cadena carboxilo lateral del AIA es la IAMT1, miembro de una familia de las carboxilo metiltransferasas, cuyos integrantes se ha descrito que pueden metilar al ácido jasmónico y al salicilato (Zubieta *et al.*, 2003). La metilación aumenta la volatilidad del AIA al igual que el metil jasmonato, su función aún no está clara pero se sabe que se trata de una forma inactiva de la hormona (Yang *et al.*, 2008).

1.9. Conclusiones y perspectivas

En los últimos años se ha avanzado en la comprensión de la biosíntesis de auxinas en las plantas, los genes

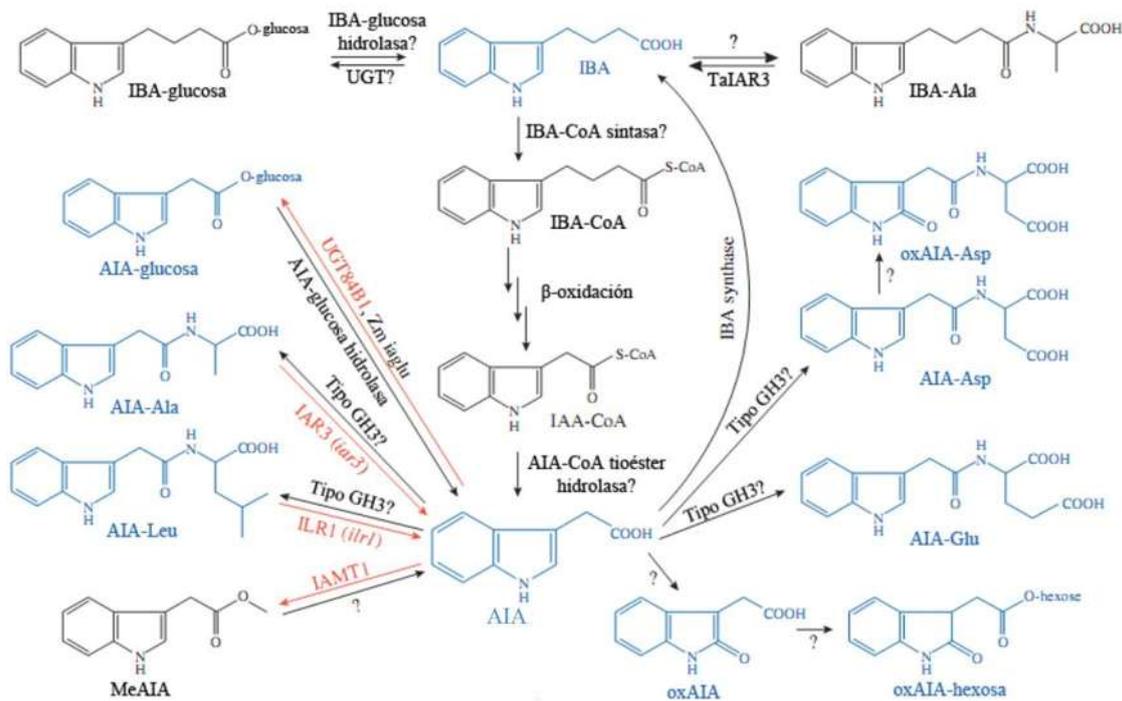


Figura 1.5. Posibles vías del metabolismo del AIA. Los compuestos cuantificados en *Arabidopsis* se muestran en azul, las enzimas cuyos genes han sido clonados en *Arabidopsis* en minúsculas cursivas y con signos de interrogación se muestran las enzimas hipotéticas para las cuales los genes no se han identificado (Modificado de Woodward y Bartel, 2005).

clave y sus funciones en el crecimiento y desarrollo. La acumulación de estos compuestos ocurre localmente en respuesta a señales ambientales y endógenas y juega un papel esencial en procesos como la formación de tejidos y órganos, así como la división, elongación y diferenciación celular. La identificación de los intermediarios de la ruta y de las enzimas que participan requiere de análisis genéticos y bioquímicos, aunados al uso de compuestos marcados con isótopos. Queda por esclarecerse como ocurre la regulación de los patrones de expresión de los genes implicados en la biosíntesis de auxinas, a nivel temporal, tejido específico y durante el desarrollo. Se requieren estudios adicionales sobre la conjugación, transporte y la señalización auxínica para comprender como las plantas modulan la homeostasis del AIA y alterar sus niveles para modificar la arquitectura de las plantas.

1.10. Referencias

- Bak S., Nielsen H. y Halkier B. 1998. The presence of CYP79 homologues in glucosinolate-producing plants shows evolutionary conservation of the enzymes in the conversion of amino acid to aldoxime in the biosynthesis of cyanogenic glucosides and glucosinolates. *Plant Mol. Biol.* 38: 725–734.
- Barratt N., Dong W., Gage D., Magnus V. y Town C. 1999. Metabolism of exogenous auxin by *Arabidopsis thaliana*: identification of the conjugate N_α-(indol-3-yl-acetyl)-glutamine and initiation of a mutant screen. *Physiol. Plant.* 105: 207–217.
- Bartel B. y Fink G. 1994. Differential regulation of an auxin-producing nitrilase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 6649–6653.
- Bartel B., McClere S., Magidin M. y Zolman B. 2001. Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: De novo synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid β-oxidation. *J. Plant Growth Regul.* 20: 198–216.
- Bartel B. y Bartel D. 2003. MicroRNAs: at the root of plant development? *Plant Physiol.* 132: 709–717.
- Bartling D., Seedorf M., Mithofer A. y Weiler E. 1992. Cloning and expression of an *Arabidopsis* nitrilase which can convert indole-3-acetonitrile to the plant hormone, indole-3-acetic acid. *Eur. J. Biochem.* 205: 417–424.
- Bartling D., Seedorf M., Schmidt R. y Weiler E. 1994. Molecular characterization of two cloned nitrilases from *Arabidopsis thaliana*: key enzymes in biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 6021–6025.
- Bowman J. 1994. *Arabidopsis: An atlas of morphology and development*. Ed. Springer-Verlag, pp 450.
- Camilleri C. y Jouanin L. 1991. The TR-DNA region carrying the auxin synthesis genes of the *Agrobacterium rhizogenes* agropine-type plasmid pRiA4: nucleotide sequence analysis and introduction into tobacco plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4: 155–162.
- Campanella J., Ludwig-Muller J., Bakllamaja V., Sharma V. y Cartier A. 2003. ILR1 and sILR1 IAA amidohydrolase homologs differ in expression pattern and substrate specificity. *Plant Growth Regul.* 41: 215–223.
- Casanova E., Trillas M., Moysset L. y Vainstein A. 2005. Influence of rol genes in floriculture. *Biotechnol. Adv.* 23: 3–39.
- Chandler J. 2009. Local auxin production: a small contribution to a big field. *Bioessays* 31: 60–70.
- Cheng Y., Dai X. y Zhao Y. 2006. Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 20: 1790–1799.
- Cheng Y., Dai X. y Zhao Y. 2007. Auxin synthesized by the YUCCA flavin monooxygenases is essential for embryogenesis and leaf formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 2430–2439.
- Cohen J. y Bandurski R. 1982. Chemistry and physiology of the bound auxins. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33: 403–430.
- Comai L. y Kosuge T. 1982. Cloning characterization of *iaaM*, a virulence determinant of *Pseudomonas savastanoi*. *J. Bacteriol.* 149: 40–46.
- Darwin C. y Darwin F. 1880. The power of movement in plants. London: John Murray.
- de Vos M., Kriksunov K. y Jander G. 2008. Indole-3-acetonitrile production from indole glucosinolates deters oviposition by *Pieris rapae*. *Plant Physiol.* 146: 916–926.
- Di Fiore S., Li Q., Leech M., Schuster F., Emans N., Fischer R. y Schillberg S. 2002. Targeting tryptophan decarboxylase to selected subcellular compartments of tobacco plants affects enzyme stability and *in vivo* function and leads to a lesion-mimic phenotype. *Plant Physiol.* 129: 1160–1169.
- Epstein E. y Ludwig-Müller J. 1993. Indole-3-butyric acid in plants: occurrence, synthesis, metabolism, and transport. *Physiol. Plant.* 88: 382–389.
- Epstein E., Cohen J. y Slovin J. 2002. The biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid changes during tomato fruit development. *Plant Growth Regul.* 38: 15–20.
- Exposito-Rodríguez M., Borges A., Borges-Pérez A. y Pérez J. 2011. Gene structure and spatiotemporal expression profile of tomato genes encoding YUCCA-like flavin monooxygenases: the ToFZY gene family. *Plant Physiol. Biochem.* 49: 782–791.
- Gallavotti A., Barazesh S., Malcomber S., Hall D., Jackson D., Schmidt R. y McSteen P. 2008. *sparse inflorescence1* encodes a monocot-specific YUCCA-like gene required for vegetative and reproductive development in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105: 15196–15201.
- Gaudin V., Camilleri C. y Jouanin L. 1993. Multiple regions of a divergent promoter control the expression of the *Agrobacterium rhizogenes* *aux1* and *aux2* plant oncogenes. *Mol. Gen. Genet.* 239: 225–234.
- Hillebrand H., Bartling D. y Weiler W. 1998. Structural

- analysis of the nit2/nit1/nit3 gene cluster encoding nitrilases, enzymes catalyzing the terminal activation step in indole-acetic acid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 36: 89–99.
- Hull A., Vaj R. y Celenza J. 2000. Arabidopsis cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 2379–2384.
- Jackson R., Lim E., Li Y., Kowalczyk M., Sandberg G., Hoggatt J., Ashford D. y Bowles D. 2001. Identification and biochemical characterization of an Arabidopsis indole-3-acetic acid glucosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 276: 4350–4356.
- Kindl H. 1993. Fatty acid degradation in plant peroxisomes: function and biosynthesis of the enzymes involved. *Biochimie* 75: 225–230.
- Kögl F. y Smit A. 1931. Über die Chemie des Wuchsstoffs. *Proc. Kon. Akad. Wetensch.* 34: 1411–1416.
- Kowalczyk M. y Sandberg G. 2001. Quantitative analysis of indole-3-acetic acid metabolites in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 127: 1845–1853.
- LeClere S., Tellez R., Rampy R., Matsuda S. y Bartel B. 2002. Characterization of a family of IAA-amino acid conjugate hydrolases from Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 277: 20446–20452.
- LeClere S., Schmelz E. y Chourey P. 2010. Sugar levels regulate tryptophan-dependent auxin biosynthesis in developing maize kernels. *Plant Physiol.* 153: 306–318.
- Ljung K., Bhaleero R. y Sandberg G. 2001. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth. *Plant J.* 28: 465–474.
- Ljung K., Hull A., Kowalczyk M., Marchant A., Celenza J., Cohen J. y Sandberg G. 2002. Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 49: 249–72.
- Ludwig-Müller J. y Hilgenberg W. 1988. A plasma membrane-bound enzyme oxidizes L-tryptophan to indole-3-acetaldoxime. *Physiol. Plant.* 74: 240–250.
- Ludwig-Müller J. y Epstein E. 1994. Indole-3-butyric acid in *Arabidopsis thaliana*. III. *In vivo* biosynthesis. *Plant Growth Regul.* 14: 7–14.
- Ludwig-Müller J. 2000. Indole-3-butyric acid in plant growth and development. *Plant Growth Regul.* 32: 219–230.
- Mano Y., Nemoto K., Suzuki M., Seki H., Fujii I. y Muranaka T. 2010. The AMI1 gene family: indole-3-acetamide hydrolase functions in auxin biosynthesis in plants. *J. Exp. Bot.* 61: 25–32.
- Mano Y. y Nemoto K. 2012. The pathway of auxin biosynthesis in plants. *J. Exp. Bot.* 63: 2853–2872.
- Mashiguchi K., Tanaka K. y Sakai T. 2011. The main auxin biosynthesis pathway in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108: 18512–18517.
- Mikkelsen M., Hansen C., Wittstock U. y Halkier B. 2000. Cytochrome P450 CYP79B2 from Arabidopsis catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid. *J. Biol. Chem.* 275: 33712–33717.
- Mikkelsen M., Fuller V., Hansen B., Nafisi M., Olsen C., Nielsen H. y Halkier B. 2009. Controlled indole-3-acetaldoxime production through ethanol-induced expression of CYP79B2. *Planta* 229: 1209–1217.
- Moore L., Warren G. y Strobel G. 1979. Involvement of a plasmid in the hairy root disease of plants caused by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plasmid.* 2: 617–626.
- Nafisi M., Goregaoker S., Botanga C., Glawischnig E., Olsen C., Halkier B. y Glazebrook J. 2007. Arabidopsis cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime in camalexin synthesis. *Plant Cell* 19: 2039–2052.
- Normanly J., Cohen J. y Fink G. 1993. *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 10355–10359.
- Normanly J., Slovin J. y Cohen J. 1995. Rethinking auxin biosynthesis and metabolism. *Plant Physiol.* 107: 323–329.
- Normanly J. 2010. Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 2(1): a001594.
- Östin A., Kowalczyk M., Bhaleero R. y Sandberg G. 1998. Metabolism of indole-3-acetic acid in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 118: 285–296.
- Patten C. y Glick B. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microb.* 68: 3795–3801.
- Pelagio-Flores R., Ortiz-Castro R., Méndez-Bravo A., Macías-Rodríguez L. y López-Bucio J. 2011. Serotonin, a tryptophan-derived signal conserved in plants and animals, regulates root system architecture probably acting as a natural auxin inhibitor in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 52: 490–508.
- Pollmann S., Neu D., Lehmann T., Berkowitz O., Schafer T. y Weiler E. 2006. Subcellular localization and tissue specific expression of amidase 1 from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 224: 1241–1253.
- Pollmann S., Duchtig P. y Weiler E. 2009. Tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis by 'IAA-synthase' proceeds via indole-3-acetamide. *Phytochemistry* 70: 523–531.
- Rampy R., LeClere S., Kowalczyk M., Ljung K., Sandberg G. y Bartel B. 2004. A family of auxin conjugate hydrolases that contributes to free indole-3-acetic acid levels during Arabidopsis germination. *Plant Physiol.* 135: 978–988.
- Rapparini F., Tam Y., Cohen J. y Slovin J. 2002. Indole-3-acetic acid metabolism in *Lemna gibba* undergoes dynamic changes in response to growth temperature. *Plant Physiol.* 128: 1410–1416.
- Ribnicky D., Cohen J., Hu W. y Cooke T. 2002. An auxin surge following fertilization in carrots: a mechanism for regulating plant totipotency. *Planta* 214: 505–509.
- Ross J., Tivendale N., Reid J., Davies N., Molesworth P., Lowe E., Smith J. y Davidson S. 2011. Reassessing the role of YUCCAs in auxin biosynthesis. *Plant Signal*