



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUIMICO-BIOLÓGICAS**

**LABORATORIO DE BIOLOGIA DEL DESARROLLO DE PLANTAS**

**CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE *Arabidopsis thaliana*  
AFECTADAS EN LAS RESPUESTAS MORFOGENÉTICAS A LA  
N-ISOBUTIL DECANAMIDA**

**Tesis que presenta**

**ALINA MORQUECHO CONTRERAS**

**Para obtener el grado de**

**Doctor en Ciencias en Biología Experimental**

**Director de Tesis: D. en C. JOSÉ LÓPEZ BUCIO**

**MORELIA, MICHOACAN, AGOSTO 2010**

## INDICE

I. RESUMEN	1
II. SUMMARY	3
III. INTRODUCCIÓN	5
ANTECEDENTES	
1.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio	7
1.2 Germinación en <i>Arabidopsis thaliana</i>	9
1.3 Morfogénesis de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i>	10
1.4 Desarrollo vegetativo	12
1.5 Reguladores del desarrollo vegetal	14
1.5.1 Auxinas	15
1.5.2 Citocininas	17
1.5.3 Giberelinas	18
1.5.4 Acido abscísico	19
1.5.5 Jasmonatos	21
1.6 Algunos de los nuevos reguladores del desarrollo vegetal	21
JUSTIFICACIÓN	26
IV. HIPÓTESIS	26
V. OBJETIVOS	
5.1 Objetivo general	27
5.2 Objetivos particulares	27
VI. RESULTADOS	28
6.1 CAPITULO I	
CHARACTERIZATION OF <i>drr1</i> , AN ALKAMIDE-RESISTANT MUTANT OF <i>ARABIDOPSIS</i> , REVEALS AN IMPORTANT ROLE FOR SMALL LIPID AMIDES IN LATERAL ROOT DEVELOPMENT AND PLANT SENESCENCE	29
6.2 CAPITULO II	
CANNABINOID-LIKE SIGNALING AND OTHER NEW DEVELOPMENTAL PATHWAYS IN PLANTS.	44

6.3	CAPÍTULO III.	
	CARACTERIZACIÓN DE LA MUTANTE HIPERSENSIBLE A LA <i>N</i> -ISOBUTIL DECANAMIDA ( <i>DECANAMIDE HYPERSENSITIVE MUTANT 1</i> ) ( <i>dhm1</i> ).	52
6.3.1	RESUMEN	52
6.3.2	ABSTRACT	53
6.3.3	INTRODUCCIÓN	54
6.3.4	MATERIALES Y METODOS	57
6.3.5	RESULTADOS	58
6.3.5.1	Caracterización genética de la mutante hipersensible a la <i>N</i> -isobutil decanamida	58
6.3.5.2	Desarrollo de la mutante <i>dhm1 in vitro</i>	59
6.3.5.3	Respuesta de <i>drr1</i> a la <i>N</i> -isobutil decanamida	61
6.3.5.4	Interacción de <i>dhm1</i> con la mutante tumorous shoot development 2 ( <i>tsd2</i> )	64
6.3.5.5	Respuesta de <i>dhm1</i> a auxinas, citocininas, ABA y GA3	65
6.3.5.6	Expresión de <i>DR5</i> y <i>ARR5</i> en <i>dhm1</i>	69
6.3.5.7	Modificaciones en la expresión de <i>CLV3</i> en <i>dhm1</i>	70
6.3.5.8	Alteraciones del tamaño celular en <i>dhm1</i>	72
6.3.5.9	Desarrollo de la mutante <i>dhm1</i> en suelo	75
6.3.6	DISCUSIÓN	76
6.3.7	CONCLUSIONES	81
6.3.8	REFERENCIAS	81
VII.	DISCUSIÓN GENERAL	85
VIII.	PERSPECTIVAS	91
IX.	REFERENCIAS COMPLEMENTARIAS	92

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la raíz de <i>Arabidopsis</i>	11
Figura 2. Etapas de formación de raíces laterales en <i>Arabidopsis</i>	12
Figura 3. Estructura del SAM y los dominios de expresión de genes relacionados.	14
Figura 4. Distribución de auxinas e interacciones moleculares entre auxinas y citocininas en el extremo de la raíz	16
Figura 5. Señalización de citocininas	18
Figura 6. Estructura de la <i>N</i> -isobutil decanamida y su efecto sobre plántulas de <i>A. Thaliana</i>	24
Figura 7. Modelo propuesto	90

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS CAPITULO III

Tabla 1. Tasa de segregación de la progenie resultante de la cruza entre la mutante <i>dhm1</i> y la planta silvestre (Col-0).	55
Tabla 2. Tasa de segregación de la progenie resultante de la cruza entre la mutante <i>dhm1</i> y la mutante <i>tumorous shoot development 2 (tsd2)</i> .	61
Figura 1. Desarrollo de <i>dhm1</i> en medio de Murashige y Skoog (MS).	57
Figura 2. Modificación en el tiempo de germinación de <i>dhm1</i> .	58
Figura 3. Respuesta de <i>dhm1</i> a la <i>N</i> -isobutil decanamida en arquitectura de raíz.	59
Figura 4. Efecto de la <i>N</i> -isobutil decanamida sobre el follaje de <i>dhm1</i> .	60
Figura 5. Efecto de la <i>N</i> -isobutil decanamida sobre la arquitectura de raíz de <i>tsd2</i> .	62
Figura 6. Efecto de los reguladores del crecimiento vegetal ácido indol acético, kinetina y ácido abscísico sobre el crecimiento de la raíz primaria de <i>dhm1</i> .	65
Figura 7. Efecto del ácido giberélico 3 sobre el crecimiento de la raíz primaria de <i>dhm1</i> .	66
Figura 8. Patrones de expresión de <i>DR5:uidA</i> y <i>ARR5:uidA</i> en plantas transgénicas y construcciones con <i>dhm1</i> .	67
Figura 9. Patrones de expresión de <i>CLV3:uidA</i> en plantas transgénicas y construcciones con <i>dhm1</i> .	69
Figura 10. Modificaciones celulares en la raíz de <i>dhm1</i> .	71
Figura 11. Área celular de hoja y peciolo en <i>dhm1</i> .	72
Figura 12. Ciclo de vida de la mutante <i>dhm1</i> en suelo.	73



## I. RESUMEN

Los lípidos pueden actuar como moléculas señal en los organismos, modulando su morfogénesis, tal es el caso de las *N*-acil etanolaminas (NAEs) y alcanidas, que se encuentran en gran variedad de plantas y cuya aplicación exógena afecta diversos procesos del crecimiento y el desarrollo. La *N*-isobutil decanamida es una alcanida bioactiva proveniente de la reducción catalítica de la afinina, que a su vez es un componente mayoritario de la raíz de *Heliopsis longipes*. La *N*-isobutil decanamida inhibe el crecimiento de la raíz primaria, induce la formación de raíces laterales y adventicias y la formación de callos sobre las hojas, indicando que las alcanidas podrían estar involucradas en el control del desarrollo de las plantas. Para identificar los componentes genéticos involucrados en las respuestas a las alcanidas, se realizaron escrutinios usando concentraciones de *N*-isobutil decanamida inhibitorias para el crecimiento de la raíz primaria en busca de mutantes de *A. thaliana* afectadas en las respuestas morfogénicas a esta alcanida, obteniéndose una mutante resistente denominada *drr1* (*decanamide resistant root 1*), cuya raíz es resistente a altas concentraciones de la alcanida y una mutante hipersensible, la *dhm1* (*decanamide hypersensitive mutant 1*), identificada por la presencia generalizada de neoplasias en las hojas. Al realizar la caracterización genética para cada una de las mutantes mediante retrocruzas con sus respectivos padres silvestres, *drr1* con *Ws* y *dhm1* con *Col-0*, se obtuvo una segregación 3:1 en la población F2 para cada caso, lo que indica que en cada una de las mutantes se encuentra afectada un gen recesivo. La caracterización del programa morfogénico de las mutantes en condiciones normales de crecimiento mostró que las plantas *drr1* presentan una disminución en la formación de raíces laterales, mientras que en *dhm1* el sistema radicular está ampliamente ramificado. Otro proceso del desarrollo afectado en la mutante *dhm1* es la germinación, ya que *dhm1* muestra una germinación más temprana que WT, indicando que las alcanidas están directamente relacionadas con dicho proceso. Al incrementar la concentración de la *N*-isobutil decanamida en el medio de cultivo, las plantas *drr1*, mantienen un crecimiento sostenido de la raíz primaria en tanto que en *dhm1*, se promueve la formación de neoplasias en las hojas.

El tratamiento con auxinas reveló respuestas similares entre plantas silvestres y *drr1* a estos reguladores, indicando que las auxinas y las alcaloides regulan la arquitectura de la raíz por diferentes vías de señalización. Además, se encontró que *drr1* también presentan resistencia a las *N*-acil-L-homoserina lactonas (AHLs), que forman parte de un grupo de reguladores de la proliferación celular en bacterias (quórum-sensing) lo que indica que las alcaloides y las AHLs son percibidas de manera similar por la planta. La característica fenotípica más notable de la mutante *drr1* es un ciclo de vida mas largo acompañado de mayor crecimiento general de la planta y mayor producción de biomasa, lo que apoya la hipótesis de que el gen afectado en la *drr1* es importante para regular el desarrollo de la raíz y la longevidad a través de la modulación de las respuestas a alcaloides en *Arabidopsis*.

Por otra parte, en *dhm1* la respuesta a auxinas, citocininas y ácido abscísico sobre el crecimiento de la raíz es similar a las plantas silvestres; mientras la respuesta a GA3 es de hipersensibilidad, lo que sugiere una interrelación entre la ruta de giberelinas y alcaloides. La transferencia del marcador *DR5:uidA* no muestra diferencias en su expresión en *dhm1*, mientras *ARR5:uidA* tiene una expresión disminuida, lo que sugiere que no hay una interacción directa con auxinas, pero sí con citocininas. En el caso de *CLV3:uidA*, existe una expresión ectópica de este regulador del meristemo apical en *dhm1* en los primeros días del desarrollo, lo que sugiere que la alcaloide esta involucrada en el desarrollo del meristemo apical. Por otra parte, el meristemo de la raíz primaria de *dhm1* es mas largo y ancho que el de Col-0; sin embargo, las células de la raíz, hoja y peciolo son mas pequeñas en *dhm1*; sugiriendo una mayor proliferación celular en *dhm1*. Estas alteraciones están relacionadas con etapas tempranas del desarrollo ya que el tiempo total del ciclo de vida no se ve modificado.

En conjunto, nuestros resultados revelan que la percepción adecuada de las alcaloides está controlada por los genes *DRR1* y *DHM1*, y que diferentes moléculas de naturaleza lipídica actúan como reguladores del crecimiento vegetal afectando múltiples programas del desarrollo desde la germinación hasta la senescencia a través de mecanismos de señalización comunes.

## II. SUMMARY

Lipids can be signal molecules used by most organisms to modulate its morphogenesis, such as NAEs and alkamides, which are found in a wide variety of plants and its exogenous application affects morphogenetic processes and plant development. *N*-isobutyl decanamide is a bioactive amide derived from catalytic reduction of affinin, this latter commonly present in high concentrations in *Heliopsis longipes* roots. *N*-isobutyl decanamide inhibits primary root growth, induces the formation of lateral and adventitious roots and the formation of neoplastic structures on leaves, showing the alkamides are involved in the control of plant development. To identify the genetic components involved in responses to alkamides, screenings using *N*-isobutyl decanamide at inhibitory concentrations for primary root growth were performed. Two *A. thaliana* mutants were isolated, the *decanamide resistant root 1* (*drr1*) shows a continuous primary root growth in high alkamide concentrations, and *decanamide hypersensitive mutant 1* (*dhm1*) is characterized by the presence of neoplastic leaves. Genetic characterization was performed for each one of the mutants through backcrossing of *drr1* with Col-0 and Ws with *dhm1*, F2 populations from these crosses showed a 3:1 segregation rate for each mutation, indicating that the alkamide-related mutants are affected in single Mendelian recessive traits. When grown under normal growth conditions, *drr1* mutants show decreased lateral root formation, whereas the *dhm1* root system shows increased branching. Another developmental process affected in *dhm1* mutants is germination, *dhm1* mutants showed earlier germination than WT plants, indicating that alkamides are directly involved in germination. At high alkamide concentrations, *drr1* seedlings sustain primary root growth, whereas in *dhm1* seedlings, neoplastic structures proliferate over leaf surfaces.

Auxin treatments in WT and *drr1* seedlings, showed similar primary root growth inhibition and lateral root induction, thus indicating that auxins and alkamides regulate root architecture by different pathways. Interestingly, *drr1* seedlings show resistance to *N*-acyl-L-homoserine lactones (AHLs), a class of signals that regulate cell proliferation in bacteria. These results suggest the plant perceives alkamides and

AHLs in similar way. The most conspicuous characteristic in *drr1* seedlings when compared to WT plants is a longer life cycle accompanied by increased plant growth and biomass production. These data indicate that the gene affected in *drr1* is crucial for root development and plant longevity regulation through modulating alkamide signaling in *Arabidopsis*.

On the other hand, *drr1* and *dhm1* root growth is similar to WT plants in response to auxin, cytokinin and ABA, but *dhm1* showed hypersensitivity to GA3, suggesting a crosstalk between gibberellin and alkamide response pathways. *DR5:uidA* auxin response marker was similarly expressed in WT and *dhm1* seedlings, while the cytokinin response marker *ARR5:uidA* was overexpressed in *dhm1*. This suggests also an interrelation between alkamides and cytokinin signaling. *CLV3:uidA*, a meristem specific marker shows ectopic expression in the *dhm1* mutant at early stages of development, suggesting that alkamides are involved in apical meristem maintenance. The primary root meristems of *dhm1* are longer and wider than WT meristems, but the cells in the elongation zone are smaller in *dhm1*, similarly, the leaf and petiole cells are smaller in the mutant, suggesting increased cell proliferation is responsible of the neoplastic shoot phenotype observed in *dhm1*. These changes are mainly seen at early stages of development and the life cycle of the mutant did not change.

Taken together, these data suggest that the correct perception of alkamides involves the action of *DRR1* and *DHM1* genes and different lipid amides may affect several growth and developmental processes in plants from germination to senescence by common signaling mechanisms.

### III. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de los organismos implica cambios en la morfología y la fisiología de las células y los tejidos a lo largo de su ciclo de vida, como consecuencia de la modulación de la expresión de genes según patrones temporales y espaciales. Las estructuras de un organismo pluricelular aparecen como consecuencia de la ejecución de programas específicos de división y proliferación celular, controlados genéticamente (Haughn *et al.* 1995). Uno de los aspectos más importantes del desarrollo es la morfogénesis, es decir la generación de la estructura corporal de un ser vivo y de cada uno de sus órganos.

De manera particular, el desarrollo vegetal tiene características distintivas, como la falta de migración celular, provocada por la presencia de una pared celular rígida, que fuerza a las células a permanecer junto a sus progenitoras, formando linajes celulares controlados por el número y plano de las divisiones celulares (Fosket 1994). Otra característica singular en el desarrollo de las plantas es la totipotencia, es decir la capacidad de dediferenciación de casi todas las células de una planta, que permite la obtención de un organismo completo a partir de cualquiera de sus partes. Además, la mayor parte del programa de crecimiento es postembrionario, ya que durante la embriogénesis se forma el plan básico del organismo y se definen los meristemas apical y radicular, los cuales mantienen la capacidad de crecimiento de la planta en etapas posteriores (Gegas y Doonan 2006).

El desarrollo vegetal está regulado por varias hormonas, las cuales actúan en varios estados del desarrollo, frecuentemente dependiendo del contexto tisular y ambiental en que se producen y con efectos pleiotrópicos (Kepinski 2006). Entre las hormonas más estudiadas se encuentran las auxinas, las citocininas, las giberelinas, el ácido abscísico y los brasinoesteroides. Para dilucidar el efecto de cada una de éstas sustancias se han utilizado plantas mutantes y líneas transgénicas afectadas en la síntesis, transporte y percepción de los diferentes reguladores (Weyers y Paterson 2001). En los últimos años, se ha considerado que otras moléculas señalizadoras podrían tener un papel importante en la regulación de los procesos morfogénicos en la raíz, tal es el caso del óxido nítrico, el L-glutamato, algunos péptidos como la

sistemia, las poliaminas, el ácido salicílico y los esfingolípidos (López-Bucio *et al.* 2006).

Los lípidos son constituyentes primordiales de las células que proporcionan la base estructural para la membrana celular y combustible para el metabolismo. Además, se ha reportado que funcionan también como mediadores de muchos procesos, como la transducción de señales, rearrreglos en el citoesqueleto y tráfico de membranas. Estos procesos son cruciales para la sobrevivencia celular, el crecimiento, la diferenciación y las respuestas de la planta al agua, la temperatura, la salinidad, las plagas y los patógenos (Wang 2004).

Algunos lípidos de tamaño pequeño pueden actuar como moléculas señal regulando el desarrollo y respuestas a estímulos ambientales (Cruz-Ramírez *et al.* 2004, Wang 2004, López-Bucio *et al.* 2007, Campos-Cuevas *et al.* 2008). Entre estas moléculas se encuentran las *N*-acetiletanolamidas (NAEs) y las alcanidas. Cuya función y mecanismos de acción en las plantas permanecen sin dilucidar, por lo antes mencionado en este trabajo se planteó un estudio genético a través del aislamiento y caracterización de mutantes tolerantes e hipersensibles a la alcanida vegetal con mayor actividad en plantas reportada por nuestro grupo de trabajo, la *N*-isobutil decanamida.

## ANTECEDENTES

### 1.1. *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio

*Arabidopsis thaliana* (L) Heinh, es una planta vascular de la clase de las dicotiledóneas, subclase dilénida, orden caparales, familia brasicaceae (Strasburger, 2004). *Arabidopsis* es un excelente modelo para el estudio de los procesos fisiológicos y la biología de las plantas. Es una angiosperma de tamaño pequeño, 30 cm, con un ciclo de vida corto (6-8 semanas), se autopoliniza, tiene una alta fecundidad, cada planta puede producir hasta 10,000 semillas, lo cual la hace de fácil manejo y la mejor opción para estudios *in vitro*. En un espacio reducido se puede tener una población de plantas considerable y observar todas sus variables morfogénicas con una relativa facilidad sin provocar ningún tipo de estrés a la planta. Además es un excelente modelo por su genoma pequeño incluido en 5 cromosomas, lo cual la hace viable para realizar estudios de mutagénesis y transformación genética (Estelle y Somerville 1986).

El genoma de *A. thaliana* es de  $1.5 \times 10^8$  pares de bases, menor que el de la mosca de la fruta, y el más pequeño de cualquier planta. Solo el 10% de su DNA nuclear se repite. Se estima que contiene aproximadamente 20,000 genes, de los cuales, algunos son constitutivos, mientras otros están altamente regulados, siendo encendidos y apagados en etapas específicas del desarrollo o en respuesta a estímulos ambientales (Taiz y Zeiger 1998).

A pesar de las pequeñas dimensiones de su genoma, *A. thaliana* presenta las características típicas de otras angiospermas en lo referente a morfología, anatomía, crecimiento, desarrollo y respuestas al ambiente. Por esta razón debe contar con el mismo número de genes esenciales que cualquier otra de las 250,000 especies de plantas con flores que han aparecido en el planeta en los últimos 150 millones de años (Meyerowitz 1994). Por tanto, se considera que a partir del estudio de este organismo se pueden obtener conclusiones extrapolables a la mayor parte de las especies vegetales (Meyerowitz 1989).

Entre los métodos de estudio utilizados para dilucidar el mapa genético de *Arabidopsis* se encuentra el uso de marcadores genéticos, moleculares, y mutantes con fenotipos visibles obtenidos por diferentes métodos de mutagénesis (Koorneef *et al.* 1991). Para la inducción de mutaciones en *A. thaliana* se han empleado métodos de mutagénesis física, química e insercional, denominándose  $M_1$  a los individuos expuestos a los efectos del mutágeno y  $M_2$  a los de su primera generación filial (Jürgens, 1995). Entre los procedimientos físicos se emplean los rayos X y el bombardeo con protones, que producen roturas cromosómicas, deleciones o reorganizaciones. El mutágeno químico mas efectivo es el sulfonato de etil metano (EMS), que es un agente quelante que causa mutaciones puntuales y pequeñas deleciones con una elevada eficacia. Este agente químico promueve intercambio de bases y es probable que produzca mutaciones con propiedades especiales como alelos débiles, dominantes o condicionales (Awan *et al.* 2008).

En cuanto a los mutágenos insercionales, se han desarrollado varios vectores portadores de marcadores selectivos de resistencia a antibióticos o herbicidas, que permiten la selección de plantas transformantes en cuyo genoma se ha integrado el DNA transferente (T-DNA), esto es un segmento del plásmido *Ti* (*tumor inducer*) de *Agrobacterium tumefaciens*. Para realizar las transformaciones por infección se realiza la inmersión de plantas adultas en un cultivo de la bacteria, dentro de un recipiente sometido a vacío parcial. Otros mutagenos insercionales son los transposones que son elementos genéticos móviles y los virus (Bechtold *et al.* 1993).

La identificación de mutaciones en un gen específico requiere el escrutinio de un gran número de líneas mutagenizadas, por lo que es necesaria la construcción y ensayo de colecciones de semilla mutagenizada. Al desarrollar ensayos dirigidos se minimiza el número de ensayos necesarios y se permite la identificación de una línea mutante individual en uno o dos pasos (Awan *et al.* 2008). Nuestro entendimiento de los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas se ha incrementado mediante el uso de *Arabidopsis* y la secuenciación del genoma completo de esta especie ayudará aún mas a dilucidar la función de cada uno de sus genes.

## 1.2. Germinación de *Arabidopsis thaliana*

Una etapa importante en el ciclo de vida de las plantas es la etapa de semilla, ya que la sobrevivencia de la especie depende de su capacidad de mantenerse durante el periodo entre la maduración de la semilla y el establecimiento de la siguiente generación, en forma de una plántula después de que ha germinado (Bentsink y Koornneef 2002). Las semillas determinan donde y cuando se establecen las plantas (Bassel *et al.* 2008).

Como un mecanismo de sobrevivencia, la semilla permanece seca, lo cual le permite sostenerse durante largos periodos en condiciones desfavorables. El mecanismo que impide la germinación bajo condiciones desfavorables es la dormancia, la cual es controlada por factores ambientales como la luz, la temperatura, la humedad, el tiempo de almacenamiento e incluso factores bióticos. El balance entre la dormancia y la capacidad del embrión para activar su desarrollo dan como resultado el proceso de germinación (Bentsink y Koornneef 2002, Finch-Savageand y Leubner-Metzger 2006).

Una semilla tiene la capacidad de germinar en un amplio rango de ambientes, los requerimientos básicos son agua, oxígeno y temperatura apropiados, aunque la semilla puede ser sensible a otros factores como la luz y nutrientes. La germinación inicia con la entrada de agua a la semilla seca, seguida por la expansión del embrión (Kucera *et al.* 2005, Finch-Savageand y Leubner-Metzger 2006).

En las semillas de angiospermas, el embrión está rodeado por dos cubiertas: el endospermo y la testa. La ruptura de ambas es esencial en la germinación. La germinación concluye cuando la radícula sale de ambas capas, para lo cual es necesaria la elongación celular (Finch-Savageand y Leubner-Metzger 2006, Müller *et al.* 2006).

En *Arabidopsis* la germinación es un proceso de dos pasos, en el cual la ruptura de la testa es seguida por la ruptura del endospermo. Esta última es inhibida por la fitohormona ácido abscísico (ABA). El efecto inhibitorio del ABA es contrarrestado por las giberelinas, con lo que la ruptura del endospermo depende del antagonismo ABA-giberelinas (Finch-Savageand y Leubner-Metzger 2006, Müller *et al.* 2006).

El ABA regula varios aspectos del crecimiento y desarrollo vegetal, así como respuestas al estrés. En las semillas, es responsable de la adquisición de reservas de nutrientes, tolerancia a la desecación, maduración y dormancia (Katagiri 2005). Las mutaciones recesivas que afectan las respuestas transcripcionales a ABA en la germinación de las semillas y el desarrollo han permitido identificar tres reguladores transcripcionales: ABI3 (Giraudat *et al.* 1992), ABI4 (Finkelstein *et al.* 1998) y ABI5 (Finkelstein y Linch 2000), cuya mutación da como resultado una dormancia reducida y una disminución en la sensibilidad a la aplicación exógena de ABA para inhibir la germinación (Söderman *et al.* 2000).

Las mutantes *abi4* y *abi5* muestran un fenotipo insensible a azúcar, además, cuatro mutantes insensibles a azúcar (*gin6*, *sun6*, *sis5* e *isi3*) son alélicas a *abi4*, lo que demuestra que ABA tiene un papel importante en la señalización de azúcares. En el caso particular de *gin6/ABI4*, *gin6* es regulado por glucosa y se expresa durante el desarrollo posterior a la germinación, regulando la expresión de ABA (Arroyo *et al.* 2003).

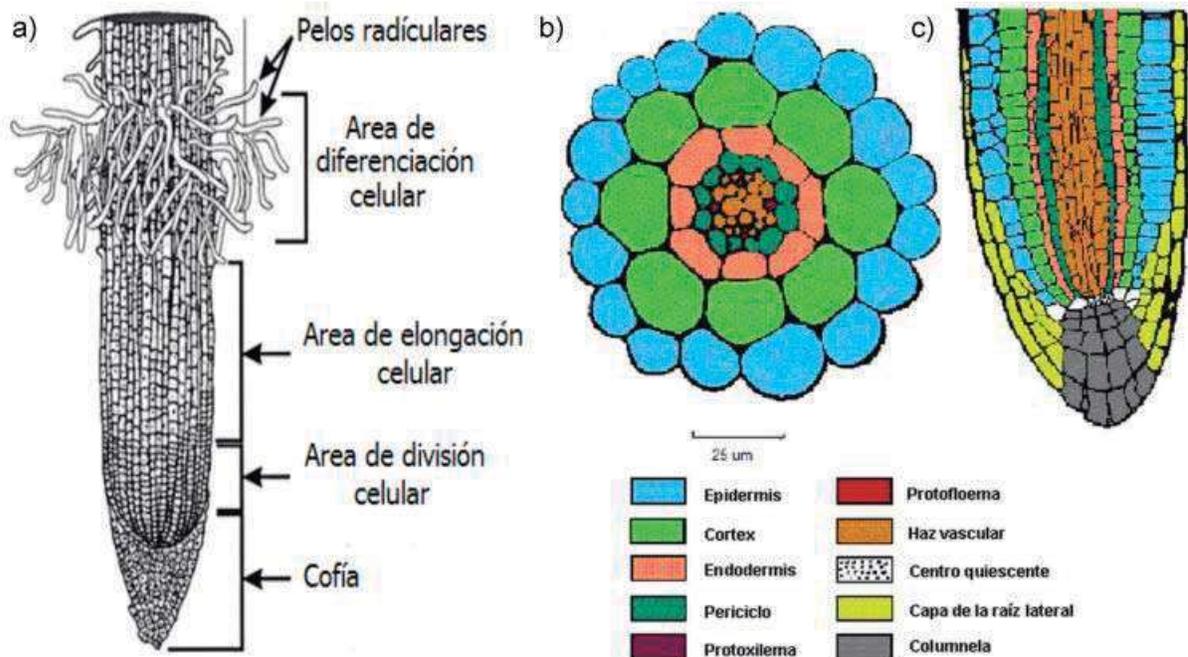
### **1.3 Morfogénesis de la raíz de *Arabidopsis thaliana***

La raíz es un órgano especializado en la absorción de agua y nutrientes del suelo, que en el caso de *A. thaliana* es experimentalmente simple y accesible. Se trata de un sistema radicular típico de una dicotiledónea, dominado por una raíz primaria que se forma durante la embriogénesis. Los tejidos de la raíz primaria se generan a partir del meristemo radicular y comprenden capas unicelulares concéntricas de epidermis, córtex, endodermis y periciclo, que rodean a los tejidos vasculares (Hardtke 2006). La disposición regular de sus tejidos y células permite predecir el origen y destino de cada una de sus partes. Los linajes celulares se puede reconocer fácilmente, ya que forman filas de células alineadas con el eje principal de la raíz como resultado de las divisiones transversales de la región meristemática (Figura 1) (Schiefelbein *et al.* 1997).

El tamaño de cada raíz depende de la actividad proliferativa del meristemo radicular. El proceso de diferenciación produce los distintos tipos celulares y tejidos presentes

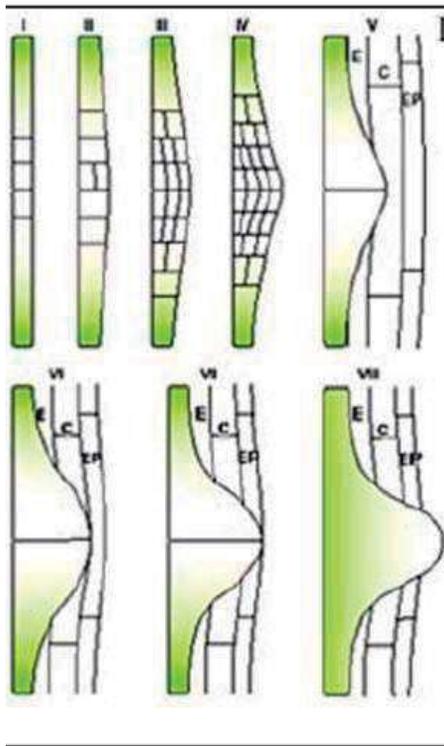
en la raíz madura. Los procesos implicados en el desarrollo de la raíz se llevan a cabo en regiones específicas, por lo que se pueden distinguir varias regiones con características morfológicas particulares: la zona de división celular, la de elongación celular, la de diferenciación celular y la de maduración celular (Figura 1) (López-Bucio *et al.* 2005).

El desarrollo postembrionario de la raíz depende del meristemo radicular. Las células madre del meristemo generan células que se encuentran en transición hacia el desarrollo, las cuales experimentan divisiones adicionales en el meristemo proximal, y se diferencian en las distintas columnas celulares en la zona de transición del meristemo que rodea el límite entre las células que se dividen y las que se expanden. Para mantener el meristemo, la tasa de diferenciación es igual al ritmo de generación de células nuevas (Ioio *et al.* 2008)



**Figura 1. Estructura de la raíz de *Arabidopsis*.** a) Áreas meristemática, de elongación y de diferenciación. b) Sección transversal de la raíz, coloreada en código. c) Sección longitudinal media del ápice de la raíz (Modificado de Ortiz-Castro 2008).

La formación de raíces laterales es importante para el desarrollo de la planta, ya que permite la construcción de sistemas radiculares ramificados (López-Bucio *et al.* 2005). Las raíces laterales se originan en las células del periciclo opuestas a los polos del xilema (Dolan *et al.* 1994) (Figura 2).



**Figura 2. Etapas de formación de raíces laterales en *Arabidopsis*.** La primera división periclinal del periciclo define el inicio de la formación de raíces laterales. Dos células fundadoras del periciclo dentro de la misma fila celular, adyacente a uno de los polos del xilema, se dividen simultáneamente creando cuatro células pequeñas. Las células hijas continúan dividiéndose simétricamente y asimétricamente, desde el centro hacia arriba y hacia abajo, creando grupos con un máximo de diez células cortas que son similares en longitud. Siguiendo un periodo de expansión radial, las células hijas se dividen periclinalmente, originando un primordio compuesto de capas internas y externas definido como etapa II. Subsecuentes divisiones dentro del primordio de la raíz lateral (denominadas etapas III-VII) que conducen por último a la emergencia (etapa VIII). El primordio de la raíz lateral sufre una expansión notable a medida que emerge desde la raíz parental (etapa VIII). Una vez emergido, el número de células cercanas al ápice de la raíz lateral se incrementa (Malamy y Benfey 1997, Casimiro *et al.* 2001, 2003).

Los patrones de desarrollo que originan primordios de raíces laterales son diferentes de los que ocurren en la formación de la raíz primaria (Casimiro *et al.* 2001), debido a que la formación de las raíces laterales incluye la reactivación del ciclo celular en el periciclo y la formación de un nuevo meristemo para la raíz lateral (Celenza *et al.* 1995, Laskowski *et al.* 1995).

#### 1.4 Desarrollo vegetativo

Los órganos de la planta, raíces, hojas y flores se desarrollan a partir de grupos indiferenciados de células denominados meristemos (Clark *et al.* 1995). Son estructuras capaces de autoperpetuarse, ya que además de producir órganos se

regeneran a sí mismos continuamente. Las células meristemáticas o iniciales conservan la capacidad de dividirse durante todo el ciclo de vida del organismo; cuando una de ellas se divide, una de las células hijas hereda las características indiferenciadas de la madre y la otra se desarrolla (Fosket 1994).

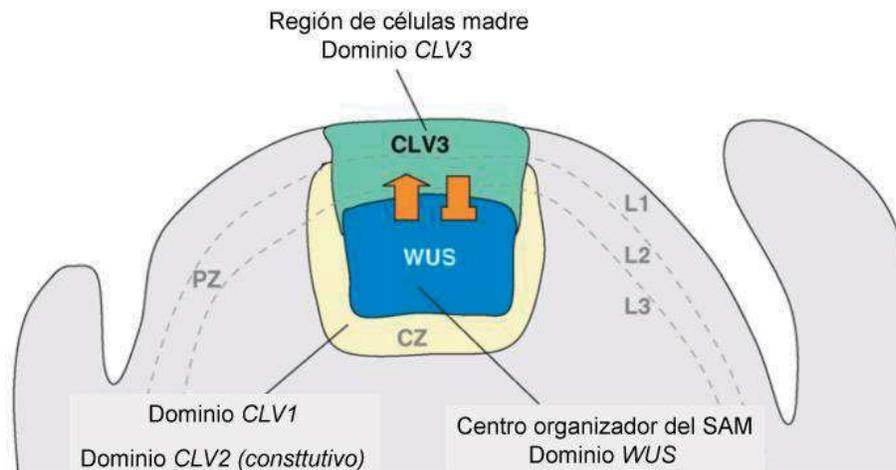
En el meristemo apical del tallo se distinguen dos regiones: la túnica y el corpus. En *Arabidopsis*, hay dos capas de túnica que recubren al corpus, manteniendo linajes separados (Barton y Poething 1993). La capa mas externa, L1, da lugar a la epidermis, mientras que la L2 y la L3 generan los tejidos centrales de la hoja y del tallo (Stewart y Dermen 1975, Gegas y Doonan 2006). En el meristemo apical mitóticamente activo, se distinguen tres zonas citológicas superpuestas a la estructura en capas de la túnica y el corpus: una zona central con grandes células que se dividen lentamente, una zona periférica que rodea a la anterior con células mas pequeñas que se dividen rápidamente y en la que se producen las primeras divisiones que darán origen a los órganos laterales, y la zona medular, debajo de la anterior en la que las células se dividen rápidamente, formando los tejidos del tallo (Leyser y Furner 1992, Gegas y Doonan 2006).

El meristemo apical es una estructura dinámica que se mantiene en constante crecimiento, división celular y formación de órganos. Aunque dicha estructura permanece a través del desarrollo vegetativo, la posición de las células cambia con el tiempo. Las células de la zona central originan células de la zona central y periférica, mientras que estas últimas se incorporan a los órganos laterales en formación (Figura 3) (Clark 1997). El meristemo actúa como una unidad biológica que controla la forma y tamaño de la planta (Gegas y Doonan 2006).

Durante el desarrollo vegetal, la función del meristemo puede cambiar y dependiendo de la naturaleza del cambio, la forma, el tamaño y la actividad proliferativa se altera dramáticamente. Así, un meristemo vegetativo genera hojas, pero durante la transición a floración, la forma del meristemo cambia y esto se relaciona con un incremento en la tasa de división celular debido a un ciclo celular más corto (Gegas y Doolan 2006).

Entre los genes implicados en el desarrollo del meristemo apical del tallo en *A. thaliana*, se encuentra SHOOT MERISTEMLESS (STM), el cual es necesario tanto para la formación como el mantenimiento del meristemo (Barton y Poething 1993, Clark *et al.* 1995). Otro gen necesario para el desarrollo normal del meristemo apical del tallo, es WUSCHEL (WUS), el cual participa en el mantenimiento funcional y estructural del meristemo y da identidad a su región central (Baurle y Laux 2005).

Un grupo de mutaciones que afectan el desarrollo del meristemo apical del tallo en *A. thaliana* son las que producen alteraciones que incluyen ensanchamiento, aplastamiento e incluso bifurcación del tallo, que en conjunto se denominan “fasciación”. Entre las mutantes asociadas al agrandamiento del meristemo apical, aumento en el número de hojas en la roseta basal y alteraciones en la filotaxia (la distribución de las hojas en un patrón regular), sin alteración de la forma de la hoja ni la raíz, se encuentran varios alelos del locus CLAVATA1 (CLV1), CLAVATA2 (CLV2) y CLAVATA3 (CLV3) (Figura 3) (Leyser y Furmer 1992, Clark *et al.* 1995).



**Figura 3. Estructura del SAM y los dominios de expresión de genes relacionados.** CLV1 Se expresa en las capas L2 y L3 en la zona central (CZ), mientras que CLV3 es expresado en L1, L2 y L3 de la misma zona. WUS es expresado solo en L3 de la CZ. PZ es la zona periférica (Fiers *et al.* 2007).

### 1.5 Reguladores del desarrollo vegetal

El crecimiento y desarrollo vegetal involucra la integración de señales ambientales y endógenas, las cuales junto con el programa genético intrínseco determinan la

morfofisiología de la planta (Gray 2004). Los responsables de cada aspecto del desarrollo vegetal, desde la embriogénesis hasta la senescencia son varias moléculas orgánicas denominadas fitohormonas o reguladores del crecimiento, (Kucera *et al.* 2005, Bishopp *et al.* 2006, Kepinski 2006).

Las fitohormonas, pueden ser consideradas mensajeros químicos que permiten la comunicación entre células, tejidos y órganos de las plantas superiores (Kucera *et al.* 2005). Entre las fitohormonas más estudiadas están las auxinas, las citocininas, las giberelinas, el ácido abscísico y los jasmonatos, cada una de las cuales actúa a bajas concentraciones para regular diversos aspectos del crecimiento y desarrollo vegetal, que se describe a continuación.

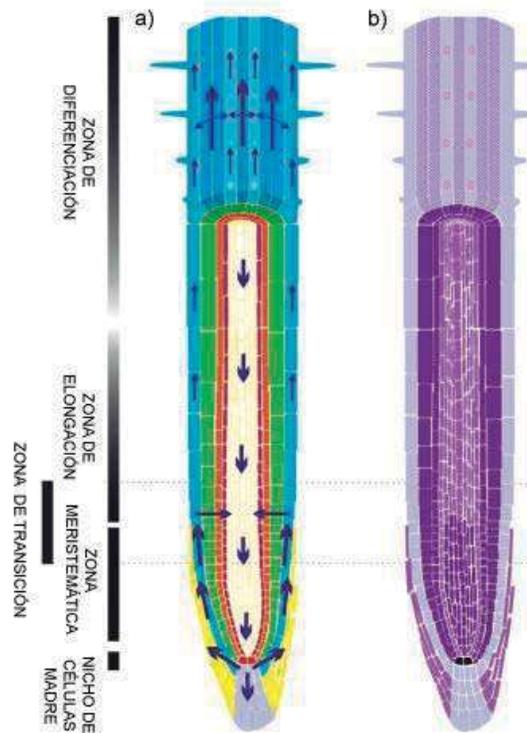
#### 1.5.1. Auxinas

Las auxinas, cuyo nombre deriva de la palabra griega *auxein* que significa crecer, regulan las respuestas trópicas a la luz y gravedad, la arquitectura general de la raíz y el follaje, la formación de los órganos y el desarrollo vascular (Teale *et al.* 2006).

La principal auxina en las plantas es el ácido indol-3-acético (AIA), sintetizado a partir del triptófano (Kende y Zeevaart 1997). El AIA actúa como molécula señal durante procesos de división, elongación y diferenciación celular, desde la embriogénesis al establecer la polaridad basal-apical y en la formación de los meristemas de la raíz y el follaje, hasta el desarrollo postembrionario (Bishopp *et al.* 2006, Teale *et al.* 2006).

La biosíntesis de auxinas ocurre tanto en el follaje como en la raíz de la planta, siendo las hojas jóvenes de gran importancia en la biosíntesis de estos compuestos (Ljung *et al.* 2001). Las auxinas sintetizadas son transportadas a tejidos específicos donde desencadenan cascadas de señalización que causan las respuestas de desarrollo (Benjamins y Sheres 2008). Las auxinas derivadas del follaje son transportadas a través de proteínas transportadoras hacia la raíz. Esto permite la formación de un gradiente de auxinas con una mayor acumulación en la parte proximal al tallo. Esta acumulación diferencial de auxinas permite una redistribución posterior hacia la zona de elongación celular y diferenciación, donde es esencial para distintos procesos morfogénicos (Figura 4) (Rashotte *et al.* 2000, Casimiro *et al.*

2001).



**Figura 4. Distribución de auxinas en la raíz.** a) Modelo esquemático del transporte y flujo de auxinas en la raíz de acuerdo a la topología de las proteínas PIN y el acarreador de eflujo AUX1 en la epidermis. La dirección y concentración relativa de la auxina es representada por las flechas. En rojo se muestra el centro quiescente, en azul las células de la epidermis, la cofia en amarillo con la columela en violeta, el cortex en verde, la endodermis en naranja, el periciclo en morado y el estele en amarillo claro. b) Mapa de la concentración de auxina, en donde el tono más oscuro representa mayor concentración (Kieffer *et al.* 2010).

Entre las respuestas de la planta a las auxinas podemos resaltar el desarrollo y la arquitectura de la raíz; en donde, las auxinas y su distribución tienen un papel crucial al permitir la formación y mantenimiento del meristemo radicular en el máximo nivel de auxinas; mientras que el gradiente permite la elongación celular (Grieneisen *et al.* 2007). Por su parte, estudios genéticos han mostrado que las mutantes *axr2*, deficientes en la respuesta a auxinas, muestran un crecimiento de raíz y follaje agravitrópicos, hipocotilo corto y crecimiento de la raíz resistente a auxinas (Wilson *et al.* 1990, Nagpal *et al.* 2000) o alteraciones en el desarrollo de raíces laterales (Casimiro *et al.* 2003). La disminución en la formación de raíces laterales puede

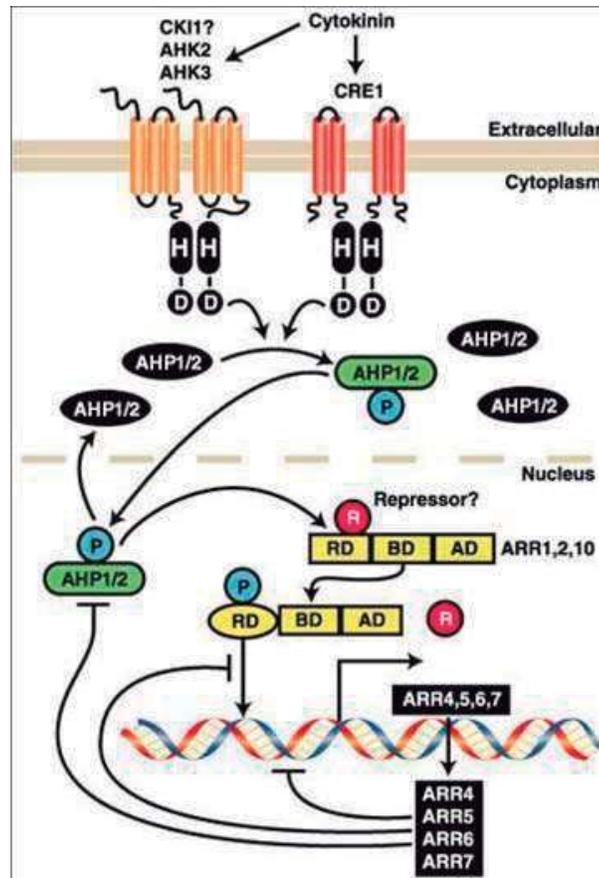
explicarse porque la escasez de auxinas mantiene las células del periciclo en la fase G1, mientras que su adición promueve la transición de la fase G1 a S, promoviendo así la formación de raíces laterales (Himanen *et al.* 2002, Teale *et al.* 2006).

### 1.5.2. Citocininas

Las citocininas comprenden una clase de moléculas señal derivadas de la adenina, implicadas en diversos procesos a través del ciclo de vida de la planta que incluyen el control de las células madre tanto en el follaje como en la raíz, la diferenciación vascular, la biogénesis de los cloroplastos, el desarrollo y ramificación del follaje, la raíz y las inflorescencias, el balance de nutrientes, la senescencia de las hojas, la tolerancia al estrés y el desarrollo de las semillas (Kieber 2002, Müller y Sheen 2007).

Las citocininas se identificaron inicialmente como moléculas capaces de inducir la división celular en plantas (Miller *et al.* 1955). Posteriormente, se determinó que las citocininas pueden activar la división celular induciendo al activador del ciclo celular Ciclina D3 (*CYCD3*) (Riou-Khamlichi *et al.* 1999, Dewitte *et al.* 2007). En concordancia con esta capacidad, las citocininas regulan la actividad de los meristemas apicales del follaje; sin embargo, se ha observado que tienen una función opuesta en el meristemo radicular. En plantas con una deficiencia moderada de citocininas se reduce el crecimiento del follaje y se acelera la elongación de la raíz (Werner *et al.* 2003).

Las células madre del meristemo apical de la raíz se encuentran en la punta de la raíz y las citocininas facilitan la salida de células indiferenciadas de la zona meristemática a la zona de elongación y su posterior diferenciación, con lo que controlan la longitud de la zona meristemática (Ioio *et al.* 2007) y permiten la diferenciación de tejidos como la vasculatura (Higuchi *et al.* 2004). Sin embargo, se requiere un nivel mínimo de citocininas para mantener la población de células madre indiferenciadas y dividiéndose en el meristemo radicular (Higuchi *et al.* 2004, Nishimura *et al.* 2004, Argyros *et al.* 2008, Ishida *et al.* 2008).



**Figura 5. Señalización de citocininas.** Las citocininas son percibidas por receptores de membrana hitidina cinasas (AHKs), los cuales fosforilan a las proteínas histidina fosfotransferasas (AHPs), que se mueven al núcleo donde transfieren el fosfato a los genes de respuesta primaria a citocininas (ARRs). En ausencia de fosforilación, los dominios de activación transcripcional están reprimidos (Maxwell y Kieber 2004).

### 1.5.3 Giberelinas.

Las giberelinas (GAs) son una gran familia de compuestos diterpenoides sintetizados a partir del geranil geranil difosfato (GGDP), con mas de 100 miembros, de los cuales solo algunos son reguladores bioactivos del crecimiento produciéndose en el sitio en que tienen su efecto. Estas controlan diversos procesos del desarrollo como la germinación de las semillas, la elongación de tallos, la expansión de las hojas, el desarrollo de tricomas y el desarrollo de flores y frutos. La concentración de GAs puede ser modificada por estímulos ambientales como luz y temperatura, por lo que pueden considerarse sensores de estos (Olszewski *et al.* 2002, Yamaguchi 2008, Gou *et al.* 2010).

Durante la germinación, las GAs promueven el crecimiento del embrión y/o reducen las restricciones físicas, impuestas por el endospermo y la testa, que impiden la protusión de la radícula. En el endospermo y cortex de ejes embrionarios de semillas de *Arabidopsis* se sintetizan GAs bioactivas, particularmente en los sitios en que las células se expanden rápidamente (Olszewski *et al.* 2002).

Uno de los efectos de las GAs bioactivas es promover la diferenciación de órganos al inducir la pérdida de la identidad meristemática. La proteína homeobox KNOTTED1-like (KNOX) es clave en la regulación del establecimiento de la identidad meristemática y la morfología de la hoja, debido a que mantiene indeterminado el estado de las células, en parte al suprimir la biosíntesis de GAs. De igual manera, el gen homeótico AGAMOUS (AG) que se expresa después de la inducción de la floración, termina la actividad meristemática y promueve el desarrollo de los órganos florales, regulando la diferenciación mediante el incremento de GAs (Yamaguchi 2008). Uno de los componentes clave en la señalización de las GAs son las proteínas nucleares represoras del crecimiento DELLA y miembros de la familia de reguladores transcripcionales GRAS (Achard y Genschik 2009).

En la raíz, la endodermis tiene un papel muy importante en la expansión celular dependiente de GAs en la elongación de la zona de crecimiento de la raíz, permitiendo que las células se expandan solo en la zona de elongación en respuesta a GAs (Ubeda-Tomás *et al.* 2008). Las GAs son muy importantes en la adaptación de la planta al estrés. Son capaces de integrar el desarrollo aéreo y de la raíz, donde la disminución del crecimiento del follaje estimula el desarrollo del sistema radicular a través de la reducción en GAs, produciendo plantas pequeñas con un sistema radicular más exploratorio (Gou *et al.* 2010).

#### 1.5.4. Ácido abscísico

El ácido abscísico (ABA) regula procesos como la maduración y dormancia de las semillas, la apertura de estomas, la tasa de crecimiento en respuesta a estrés ambiental incluyendo sequía, frío y salinidad. El ABA se sintetiza principalmente en los tejidos vasculares y es movilizado al tejido blanco, aunque también puede ser producido en el sitio en que se utiliza (Nambara y Marion Poll 2005).

El ABA actúa a través de una cadena de señalización de muchos componentes que incluye factores de transcripción, proteínas de unión a RNA, cinasas y fosfatasas (Finkelstein *et al.* 2002, Huang *et al.* 2007). Sin embargo, en el caso del ABA, no existe un modelo universal de su señalización, debido a que en los diferentes tipos celulares en los que ABA es activo se manifiesta con distintos resultados fisiológicos (Wasilewska *et al.* 2008). La señalización propuesta incluye proteínas G, lipasas, fosfatasas y cinasas en los primeros eventos, seguido de la liberación de un segundo mensajero, para lo cual se ha propuesto al inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>), al Ca<sup>+</sup> y al K<sup>+</sup> que actúan en la regulación de la función estomática y la expresión de genes de respuesta a estrés, aparentemente a través de cascadas de fosforilación (Huang *et al.* 1995, Finkelstein *et al.* 2002).

En la mayoría de los tejidos vegetativos, los genes regulados por ABA están involucrados en respuestas a estrés abiótico y su principal respuesta es la deshidratación celular. En semillas en proceso de maduración, los genes regulados por ABA incluyen aquellos necesarios para la síntesis de reservas y la adquisición de tolerancia a la desecación (Finkelstein *et al.* 2002).

En etapas iniciales de la embriogénesis el ABA previene el aborto de la semilla y promueve el crecimiento del embrión. En contraste, durante la fase tardía de la embriogénesis el ABA se incrementa y bloquea el crecimiento del embrión. Este compuesto es necesario para inducir la dormancia de la semilla y la germinación es precedida por una disminución de los niveles de ABA. En contraste, semillas dormantes mantienen sus niveles elevados (Nambara y Marion-Poll 2005). Es considerado un integrador de diferentes señales ambientales y una de las respuestas ante estos estímulos es el desarrollo de primordios de raíces laterales (De Smet *et al.* 2006)

#### 1.5.5 Jasmonatos

El ácido jasmónico (JA) y su metil ester, el metil jasmonato (JAMe), son ácidos grasos derivados de ciclopentanonas ubicuas en las plantas (Creelman y Mullet 1995). Entre sus funciones esta regular la respuesta a estímulos externos, particularmente cuando existen heridas y ataques de patógenos (Creelman y Mullet, 1995, Mosblech *et al.* 2010, Truman *et al.* 2010). Al sufrir una herida la planta acumula rápidamente JA en el sitio afectado (Browse 2005) y posteriormente desencadena la inducción de genes de respuesta que incluyen la formación de MeJA y la conjugación de JA con aminoácidos como isoleucina, que son mediadores de la respuesta hipersensible (Glazebrook 2005), que es empleada para limitar que los microorganismos se expandan a través de la infección de tejido vegetal (Mosblech *et al.* 2010).

JA puede influir sobre varios aspectos del crecimiento y desarrollo de plantas. Los jasmonatos pueden inducir la senescencia y la muerte celular programada, las hojas senescentes de *Arabidopsis* muestran un incremento en los niveles de JA y en la expresión de genes que regulan la biosíntesis de JA (He *et al.* 2002) y la abscisión de las hojas e inhibir la germinación (Creelman y Muller, 1995). También inhiben el crecimiento de la raíz primaria (Staswick *et al.*, 1992).

### **1.6 Algunos de los nuevos reguladores del desarrollo vegetal**

Recientemente se han adicionado otros compuestos como potenciales reguladores del desarrollo vegetal, entre los que se pueden mencionar las poliaminas, jasmonatos, ácido salicílico, péptidos como la sistemina, el glutamato, el óxido nítrico y diversas moléculas con estructura lipídica.

Los lípidos son constituyentes primordiales de las células. Proporcionan la base estructural para la membrana celular y son combustibles para el metabolismo. Además, funcionan como mediadores de muchos procesos, como la transducción de señales, rearrreglos en el citoesqueleto y el tráfico de membranas. Estos procesos son cruciales para la sobrevivencia celular, el crecimiento, la diferenciación y las respuestas de la planta al agua, la temperatura, la salinidad, las plagas y los patógenos (Wang, 2004).

Algunos lípidos de tamaño pequeño pueden actuar como moléculas señal que regulan el desarrollo y las respuestas a estímulos ambientales. Entre estas moléculas se encuentran las *N*-acetiletanolamidas (NAEs) y las alcanidas (López-Bucio *et al.*, 2006).

Las NAEs fueron reportadas inicialmente como componentes de la lecitina de soya y los cacahuates. Posteriormente, han sido identificadas en semillas disecadas de monocotiledóneas y dicotiledóneas como algodón, maíz, *Arabidopsis*, soya, cacahuate, tomate y chícharo en concentraciones que van de 500 a 1600 ng/g de peso fresco. (Chapman, 2004). Las alcanidas por su parte, se encuentran desde líquenes (ej. *Stereocaulon alpinum*) hasta angiospermas, particularmente en las familias Asteraceae, Brassicaceae, Leguminosae, Piperaceae y Rutaceae (Gertsch *et al.*, 2006; López-Bucio, 2006).

Se ha propuesto que las NAEs y las alcanidas funcionan como reguladoras de procesos asociados con la división y expansión celular, así como con el desarrollo de plántulas, la germinación de las semillas, la apertura de los estomas y la respuesta a patógenos (Chapman, 2004; Ramírez-Chávez *et al.*, 2004; Motes *et al.*, 2005; López-Bucio *et al.*, 2007).

Se ha observado que en *A. thaliana*, cuando se agregan concentraciones micromolares de NAE 12:0 y NAE 18:2 se inhibe el desarrollo de la raíz y se interrumpe el crecimiento celular normal de una forma dosis-dependiente y selectiva (Blancaflor *et al.*, 2003; Motes *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006).

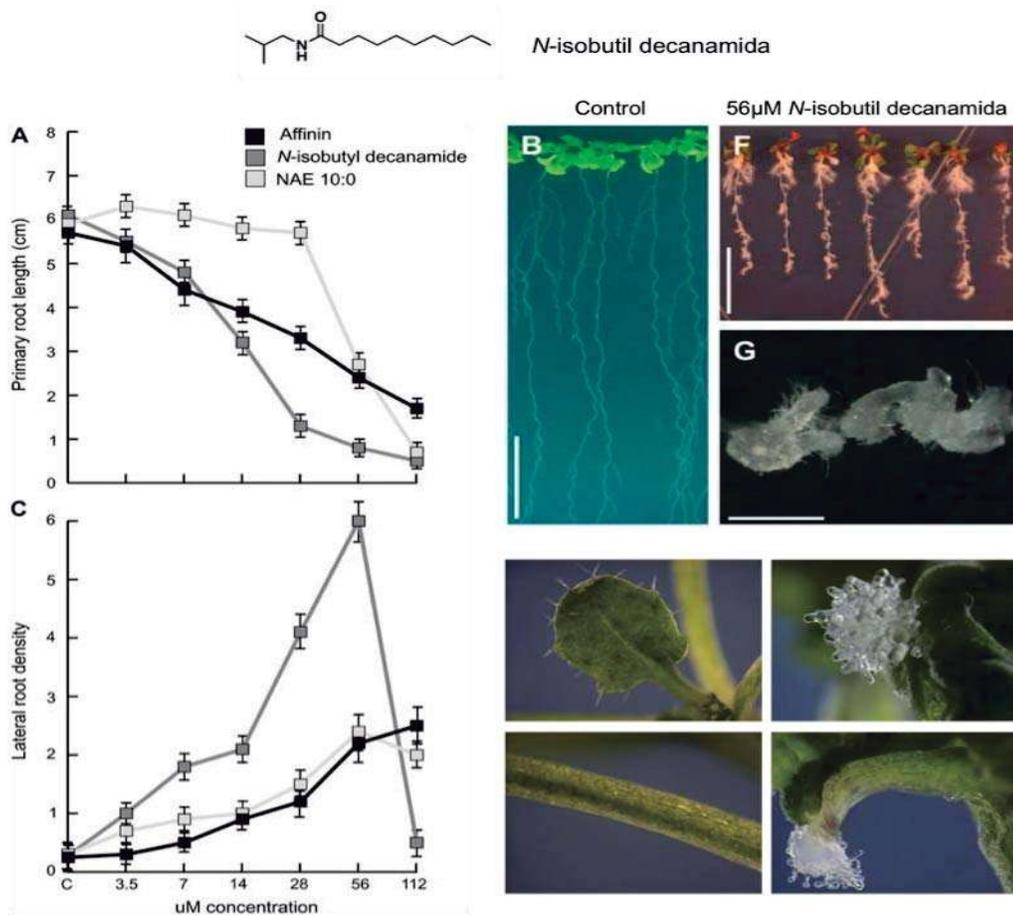
Por otra parte, las alcanidas también actúan como reguladores del crecimiento vegetal. Por ejemplo, la amidenina, alcanida no sustituida con tres instauraciones en la cadena de ácido graso, aislada del actinomiceto *Amycolatopsis sp.*, en concentraciones de  $0.6 \times 10^{-6}$  M hasta  $1.8 \times 10^{-5}$  M estimula en un 20% el crecimiento del follaje y hasta un 50% el crecimiento de la raíz en plantas de arroz; sin embargo, a una concentración de  $6.0 \times 10^{-5}$  M mostró un efecto represor del crecimiento en un 50% en la parte aérea y casi un 30 % en la raíz (Kanbe *et al.*, 1993).

Otro ejemplo se encuentra en el trabajo de Ramírez-Chávez y colaboradores (2004),

en donde se caracterizó el efecto de la afinina y dos alcanidas derivadas de ella, la *N*-isobutil-2E-decanamida y la *N*-isobutil decanamida, sobre el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis*, observándose que la afinina altera el desarrollo de *A. thaliana* de manera dosis-dependiente, a bajas concentraciones del orden de 3.2 mg/l de afinina, se observa una estimulación de la germinación, de la longitud de la raíz primaria y de la emergencia de raíces laterales. Mientras que a concentraciones mas altas del orden de 12.5 y 25.0 mg/l se observa una inhibición del crecimiento de la raíz primaria en un 70% y una estimulación de la emergencia de raíces laterales. Las alcanidas derivadas de afinina fueron más activas en la estimulación del crecimiento de los pelos radiculares. Estos efectos de las alcanidas fueron independientes de la vía de señalización de auxinas, como lo reveló el desarrollo normal de mutantes resistentes a auxinas (*aux1-7*, *eir1* y *axr4-2*) en respuesta a tratamientos con alcanidas y por la nula capacidad de estos compuestos para afectar la expresión de los genes marcadores de auxinas *DR5:uidA* y *BA3:uidA*.

En nuestro grupo de trabajo se realizó un estudio en el que se encontró que la longitud de la cadena acilada y la presencia del grupo amida determinan su actividad biológica, siendo la *N*-isobutil decanamida, una alcanida saturada de 10 carbonos, la molécula mas activa en la inhibición del crecimiento de la raíz primaria y la formación de raíces laterales. La inducción de la actividad proliferativa de esta alcanida se observó por la formación de estructuras tipo callo en la raíz primaria, hojas ectópicas sobre los peciolos de las hojas de roseta y neoplasias originadas de la lamina de la hoja (Figura 6). La formación de órganos ectópicos inducidos por la *N*-isobutil decanamida esta relacionado con el incremento en la expresión del marcador de división celular *CyCB1:uidA* y del marcador inducible por citocininas *ARR5:uidA* tanto en raíces como en el follaje. Además se encontró que la actividad de la *N*-isobutil decanamida interactúa con la ruta de señalización de citocininas, ya que la triple mutante de los receptores de citocininas *CRE1/AHK2/AHK3* de *A. thaliana* mostró la ausencia de la formación de órganos ectópicos y ausencia de estructuras tipo callos en las laminas de las hojas. Es por ello que se propone que las alcanidas podrían representar una nueva clase de reguladores endógenos del crecimiento que interactúan con la vía de señalización de las citocininas que controlan la actividad

meristemática y procesos de diferenciación durante el desarrollo vegetal (López-Bucio *et al.*, 2007).



**Figura 6. Estructura de la *N*-isobutil decanamida y su efecto sobre plántulas de *A. thaliana*.** Se muestra el efecto represor de este compuesto sobre el crecimiento de la raíz primaria, la inducción de raíces laterales y la formación es estructuras tipo callo sobre las láminas y los peciolo de las hojas (López-Bucio *et al.*, 2007).

En otro estudio de nuestro grupo de trabajo, se elucidaron las propiedades regenerativas de las alcanamidas y su papel en el desarrollo vegetal, para lo cual se utilizaron distintas concentraciones de *N*-isobutil decanamida y afinina en un sistema de cultivo de explantes de *A. thaliana in vitro*. En explantes obtenidos a partir del meristemo apical se desarrollan completamente los sistemas aéreo y radicular, mientras que en explantes obtenidos a partir del tallo o de raíces primarias se desarrollan dos clases de estructuras regenerativas: raíces adventicias y raíces laterales. El tratamiento con *N*-isobutil decanamida mostró un efecto dosis

dependiente sobre la formación de raíces laterales y adventicias en explantes de tallo y raíz primaria, así como en el crecimiento de las plantas regeneradas. Se encontró que la *N*-isobutil decanamida y la afinina tienen un efecto estimulador sobre la formación de raíces adventicias, independiente de la señalización de auxinas. Además, se encontró que la *N*-isobutil decanamida induce la acumulación de óxido nítrico en los sitios de proliferación de raíces adventicias. Por lo que se sugiere que las alcanidas regulan el desarrollo de las raíces adventicias, probablemente a través de la vía de señalización del óxido nítrico (Campos-Cuevas *et al.* 2008).

Las alcanidas y las NAEs no sólo están conservadas en los eucariontes. En una búsqueda de compuestos con estructura química similar en las bacterias, se identificó a las *N*-acil homoserina lactonas (AHLs), también conocidos como autoinductores o compuestos de "quórum sensing" de suma importancia en la comunicación célula-célula en bacterias. Al evaluar diferentes AHLs de 4 a 14 carbonos sobre el desarrollo postembrionario de la raíz de *A. thaliana* se encontró que los compuestos afectan el crecimiento de la raíz primaria, la formación de raíces laterales y el desarrollo de pelos radicales, particularmente la *N*-decanoil homoserina lactona, que es considerada la AHL mas activa para alterar la arquitectura del sistema radicular. Estos cambios en el desarrollo están relacionados con la alteración en la expresión de los marcadores del ciclo celular *CyCB1:uidA* y *PRZ1:uidA* y de diferenciación *AtEXP7:uidA* en la raíz. Aunque los efectos de la *N*-decanoil-HL son muy similares a los producidos por las auxinas en la modulación de la arquitectura del sistema radicular, las respuestas de la raíz primaria y de las raíces laterales a este compuesto resultaron independientes de la ruta de señalización de auxinas. Además, las líneas mutante y sobreexpresora de *AtFAAH* muestran respuestas alteradas a C10-HL, indicando que la amido hidrolasa de *Arabidopsis* es capaz de hidrolizar AHLs de origen bacteriano. Estos resultados sugieren que las AHLs pueden regular el desarrollo en *Arabidopsis* y que las plantas poseen la maquinaria enzimática para metabolizar estos compuestos (Ortiz-Castro *et al.* 2008).

## JUSTIFICACIÓN

Tanto la regulación del crecimiento como la respuesta a cambios ambientales requieren de un control estricto dentro de cada organismo, en los que participan diversas rutas de transducción de señales moduladas por factores hormonales. En el caso de las plantas esta comunicación es facilitada por los reguladores del crecimiento, entre las que destacan las auxinas, las giberilinas, el etileno y el ácido absísico; sin embargo, no son las únicas moléculas capaces de mediar las respuestas antes mencionadas. Se ha reportado que algunos lípidos de cadena corta pueden llevar a cabo esta función, como las oxilipinas, el ácido jasmónico y otras moléculas como las alcanidas cuya posible contribución aun no ha sido dilucidada. Dentro de estas últimas, se encuentra la *N*-isobutil decanamida, por lo que en este trabajo se planteó estudiar el efecto de esta molécula en el desarrollo de *A. thaliana* mediante la identificación de mutantes alteradas en la respuesta de la raíz o del follaje a la aplicación exógena de esta molécula. El estudio detallado de las mutantes identificadas permitirá conocer los procesos del desarrollo que son controlados por las alcanidas en plantas, así como entender los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la respuesta a estas moléculas.

## IV. HIPÓTESIS

La vía de percepción que involucra a la *N*-isobutil decanamida es necesaria para el desarrollo normal de la planta y las mutantes de *Arabidopsis thaliana* afectadas en las respuestas morfogénicas a esta molécula presentaran alteraciones notables en su fenotipo.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Caracterizar mutantes de *Arabidopsis thaliana* afectadas en las respuestas morfogénicas a la *N*-isobutil decanamida.

### 5.2 Objetivos Particulares

- I. Caracterizar fenotípicamente a las mutantes *drr1* (*decanamide resistant root 1*) y *dhm1* (*decanamide hypersensitive mutant 1*) que muestran resistencia e hipersensibilidad a la *N*-isobutil-decanamida respectivamente.
- II. Determinar la dominancia o recesividad de las mutaciones mediante un análisis genético de las mutantes.
- III. Estudiar los cambios morfológicos y fisiológicos que ocurren en la raíz y el follaje de plantas silvestres y mutantes de *A. thaliana*, en condiciones normales de crecimiento y en presencia de *N*-isobutil decanamida.
- IV. Estudiar la expresión genética de marcadores de ciclo celular y de respuesta a hormonas vegetales movilizados a las plantas mutantes.

## VI. RESULTADOS

Esta sección corresponde a los capítulos publicados con los datos generados durante la realización de esta tesis. El capítulo I, corresponde al artículo de investigación original publicado en la revista *Plant Physiology* (2010) 152:1659-1673, donde se describe el aislamiento y la caracterización de la mutante resistente a alcaloides *drr1*. El capítulo II contiene un artículo de revisión publicado en la revista International *Journal of Plant Developmental Biology* (2007) 1:34-41, donde se presenta el conocimiento de actualidad sobre los alcaloides y *N*-acil-etanolaminas y sus mecanismos de acción en las plantas. Finalmente, el capítulo III contiene los resultados del análisis de la mutante hipersensible a alcaloides *dhm1*.

## 6.1 CAPITULO I

# Characterization of *drr1*, an Alkamide-Resistant Mutant of *Arabidopsis*, Reveals an Important Role for Small Lipid Amides in Lateral Root Development and Plant Senescence<sup>[C][W][OA]</sup>

Alina Morquecho-Contreras, Alfonso Méndez-Bravo, Ramón Pelagio-Flores, Javier Raya-González, Randy Ortíz-Castro, and José López-Bucio\*

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, CP 58030 Morelia, Michoacán, Mexico

Alkamides belong to a class of small lipid signals of wide distribution in plants, which are structurally related to the bacterial quorum-sensing signals *N*-acyl-L-homoserine lactones. *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) seedlings display a number of root developmental responses to alkamides, including primary root growth inhibition and greater formation of lateral roots. To gain insight into the regulatory mechanisms by which these compounds alter plant development, we performed a mutant screen for identifying *Arabidopsis* mutants that fail to inhibit primary root growth when grown under a high concentration of *N*-isobutyl decanamide. A recessive *N*-isobutyl decanamide-resistant mutant (*decanamide resistant root* [*drr1*]) was isolated because of its continued primary root growth and reduced lateral root formation in response to this alkamide. Detailed characterization of lateral root primordia development in the wild type and *drr1* mutants revealed that *DRR1* is required at an early stage of pericycle cell activation to form lateral root primordia in response to both *N*-isobutyl decanamide and *N*-decanoyl-L-homoserine lactone, a highly active bacterial quorum-sensing signal. Exogenously supplied auxin similarly inhibited primary root growth and promoted lateral root formation in wild-type and *drr1* seedlings, suggesting that alkamides and auxin act by different mechanisms to alter root system architecture. When grown both in vitro and in soil, *drr1* mutants showed dramatically increased longevity and reduced hormone- and age-dependent senescence, which were related to reduced lateral root formation when exposed to stimulatory concentrations of jasmonic acid. Taken together, our results provide genetic evidence indicating that alkamides and *N*-acyl-L-homoserine lactones can be perceived by plants to modulate root architecture and senescence-related processes possibly by interacting with jasmonic acid signaling.

Plant growth and development require the integration of a variety of environmental and endogenous signals, which together with the intrinsic genetic program determine plant form and longevity. Lipids have long been recognized as signals that have the capacity to trigger profound physiological responses. In animals, ceramides and sphingosines are lipids that have proapoptotic and antiproliferative actions (Wymann and Schneider, 2008). In plants, ceramides, sphingosines, and phosphatidic acid are involved in mediating

plant growth, development, and responses to environmental stimuli (Worrall et al., 2003; Wang, 2004).

In the past few years, additional small lipids have been found to act as plant signals, including alkamides and *N*-acyl-ethanolamines (NAEs). Alkamides comprise at least 200 amides with varied acyl chain lengths and saturation grades (for review, see López-Bucio et al., 2006; Morquecho-Contreras and López-Bucio, 2007). These compounds have been found to alter root and shoot system architecture in *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*; Ramírez-Chávez et al., 2004; Campos-Cuevas et al., 2008). NAEs represent compounds with aminoalcohol linked as an amide to the fatty acid. They are likely produced from the hydrolysis of *N*-acyl-phosphatidylethanolamines, a minor constituent of cell membranes, by phospholipase D (Chapman, 2004). NAEs have been found to accumulate in seeds of some higher plants, including cotton (*Gossypium hirsutum*), corn (*Zea mays*), *Arabidopsis*, soybean (*Glycine max*), tomato (*Solanum lycopersicum*), and pea (*Pisum sativum*), and their levels decline during germination (Wang et al., 2006).

Many gram-negative bacteria produce alkamide-related substances termed *N*-acyl-L-homoserine lactones (AHLs). These compounds participate in

<sup>1</sup> This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (grant nos. 43978 and 60999) and the Consejo de la Investigación Científica (grant no. CIC 2.26).

\* Corresponding author; e-mail jlbucio@zeus.umich.mx.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors ([www.plantphysiol.org](http://www.plantphysiol.org)) is: José López-Bucio (jlbucio@zeus.umich.mx).

[C] Some figures in this article are displayed in color online but in black and white in the print edition.

[W] The online version of this article contains Web-only data.

[OA] Open Access articles can be viewed online without a subscription.

[www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.109.149989](http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.109.149989)

cell-to-cell signaling that is usually referred to as quorum sensing (Pearson et al., 1994). The AHL signals contain a conserved HL ring and an N-linked acyl side chain. The acyl-chain moiety of naturally occurring AHLs can differ in length and substitution at position C3, which is either unmodified or carries an oxo or hydroxyl group (Pearson et al., 1994; Parsek et al., 1999). These molecules are freely diffused through the bacterial membrane, which is to some extent dependent upon the length of the acyl side chain and the nature of any C3 substitutions and distribute within the rhizosphere (Pearson et al., 1999; Schuëgger et al., 2006; Scott et al., 2006). Evidence has accumulated indicating that plants are able to perceive AHLs. The application of AHLs to *Medicago truncatula* and *Arabidopsis* plants resulted in differential transcriptional changes in roots and shoots, affecting the expression of genes potentially involved in development (Mathesius et al., 2003; Von Rad et al., 2008). Ortiz-Castro et al. (2008) evaluated *Arabidopsis* growth responses to a variety of saturated AHLs ranging from four to 14 carbons in length, focusing on alterations in postembryonic root development. The compounds affected primary root growth, lateral root (LR) formation, and root hair development. While this information clearly indicates that plants are able to sense a variety of small lipid signals, including alkamides, NAEs, and AHLs, which modulate root architecture, the genetic mechanisms involved in signal perception to these compounds are unknown.

The *Arabidopsis* root system is an excellent model to dissect the genetic and developmental processes that determine plant architecture. It mainly consists of an embryonic primary root and postembryonic developed LRs (López-Bucio et al., 2005). LR formation is influenced by a wide range of environmental cues, such as nutrients and water availability in the soil (López-Bucio et al., 2003; Malamy, 2005; Nibau et al., 2008). The plasticity of LR formation is of critical importance, allowing plants to compete for resources and adapt to constantly changing growth conditions. LRs originate from pericycle founder cells located opposite to xylem poles, which undergo several rounds of anticlinal divisions to create a single-layered primordium composed of up to 10 small cells of equal length (termed stage I; Dolan et al., 1993; Malamy and Benfey, 1997; Dubrovsky et al., 2001). Further anticlinal and periclinal divisions create a dome-shaped primordium (spanning stages III–VII), which eventually emerges from the parental root (Malamy and Benfey, 1997; Casimiro et al., 2003; Péret et al., 2009).

The phytohormone auxin (indole-3-acetic acid [IAA]) plays an important role during each stage of LR formation (De Smet et al., 2006; Fukaki et al., 2007; Dubrovsky et al., 2008; Fukaki and Tasaka, 2009). Application of IAA or synthetic auxins such as 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid or naphthaleneacetic acid (NAA) stimulates LR formation (Celenza et al., 1995; Woodward and Bartel, 2005), whereas polar auxin transport inhibitors such as *N*-(1-naphthyl)-

phthalamic acid and 2,3,5-triiodobenzoic acid prevent LR formation (Casimiro et al., 2001; Himanen et al., 2002). Consistently, *Arabidopsis* mutants with increased auxin levels, such as *rooty* and its alleles *aberrant lateral root formation1* and *superroot1*, have increased numbers of LRs (Boerjan et al., 1995; Celenza et al., 1995; King et al., 1995), while mutants with defective auxin transport, perception, or signaling, including *aux1*, *axr1*, and *tir3/doc1/big*, show reduced LR formation (Lincoln et al., 1990; Gil et al., 2001; Swarup et al., 2001). In contrast to auxin, less is known about the action of alkamides, AHLs, and other related small lipid signals on LR formation and whole plant development.

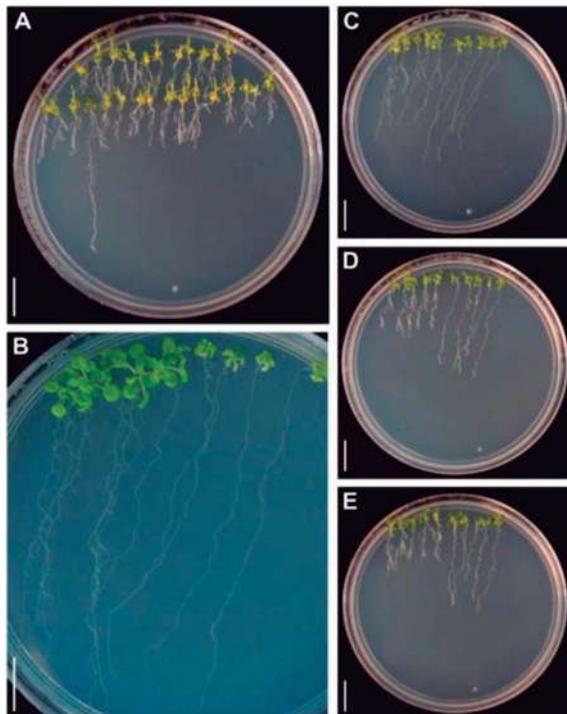
To identify the genetic components responsible for the root architectural responses to alkamides, we performed a visual screening for *Arabidopsis* mutants that under high *N*-isobutyl decanamide concentration do not manifest primary root growth reduction. We isolated an *N*-isobutyl decanamide-resistant mutant (*decanamide resistant root [drr1]*) defective in a single recessive trait. Detailed cellular and developmental studies of wild-type and *drr1* plants indicate that *drr1* mutants show resistance to primary root growth inhibition and LR growth promotion induced by both an alkamide (*N*-isobutyl decanamide) and a bacterial quorum-sensing signal (*N*-decanoyl-L-homoserine lactone [C10-AHL]). We further show that *DRR1* is a crucial component of the regulation of plant senescence, which likely links alkamide and jasmonic acid (JA) in modulating plant longevity and LR development.

## RESULTS

### Isolation of *drr1*, an *Arabidopsis* Mutant with Altered Primary Root Growth Response to *N*-Isobutyl Decanamide

From a group of similar chain length alkamides and NAEs, López-Bucio and coworkers (2007) identified *N*-isobutyl decanamide, a C10 saturated alkamide that is naturally produced in *Acmella radicans* (Ríos-Chávez et al., 2003) and *Cissampelos glaberrima* (Laurerio-Rosario et al., 1996), as the most active compound in inhibiting primary root growth and stimulating LR formation in *Arabidopsis*.

To investigate the genetic basis of plant responses to alkamides, we screened 25,000 lines from T-DNA insertion mutant collections (Krysan et al., 1999) by inspecting the root architecture of plants grown over the surface of 0.2× Murashige and Skoog (MS) agar plates supplied with 30 μM *N*-isobutyl decanamide. A mutant line was isolated that, in contrast to the wild type, was able to sustain primary root growth under this inhibitory concentration of the alkamide (Fig. 1A). The mutant was backcrossed to wild-type plants (*Wassilewskija* [Ws] ecotype) three times prior to detailed phenotypical analysis. In F2 progeny from these crosses, in plants grown in medium supplied



**Figure 1.** Genetic screen and phenotypic characterization of *drr1* mutants. A, Photograph of an agar plate supplied with 30  $\mu\text{M}$  *N*-isobutyl decanamide showing a putative *drr1* mutant with long primary root. B, Five 14-d-old wild-type (Ws) and *drr1* seedlings grown side by side on the surface of agar plates containing 0.2 $\times$  MS medium lacking *N*-isobutyl decanamide. C to E, Photographs of agar plates supplied with 20  $\mu\text{M}$  (C), 25  $\mu\text{M}$  (D), or 30  $\mu\text{M}$  (E) *N*-isobutyl decanamide, showing five wild-type (left) and *drr1* (right) plants grown side by side. Photographs in B and C are representative individuals of four plates per treatment. Bars = 1 cm. [See online article for color version of this figure.]

with 30  $\mu\text{M}$  *N*-isobutyl decanamide, the line segregated the mutant phenotype in a 1:3 ratio (Table 1). These results indicate that the primary root growth resistance to the alkamide resulted from a recessive single-gene mutation. We named this locus *drr1*. To further study the developmental alterations induced by *N*-isobutyl decanamide in wild-type and *drr1* plants, we grew ecotype Ws and *drr1* plants side by side on vertically oriented agar plates with varied alkamide contents. Wild-type plants grown in 0.2 $\times$  MS agar

medium without *N*-isobutyl decanamide showed a typical root system, consisting of a long primary root with many LR forming in a gradient from the root/shoot junction to the primary root tip (Fig. 1B). In the same medium, *drr1* mutants developed a long primary root lacking visible LR (Fig. 1B), thus indicating that *DRR1* is important for normal LR development under normal growth conditions. In wild-type plants treated with 20, 25, or 30  $\mu\text{M}$  *N*-isobutyl decanamide, there was a dose-dependent inhibitory effect of the alkamide on primary root growth, which correlates with an increase in LR formation. In these plants, multiple LR developed, giving rise to a highly exploratory root system with different architecture from that observed in plants grown in medium without *N*-isobutyl decanamide (Fig. 1, C–E). In contrast, alkamide-treated *drr1* mutants showed longer primary roots and reduced LR formation when compared with wild-type plants in most concentrations of *N*-isobutyl decanamide tested (Fig. 1, C–E).

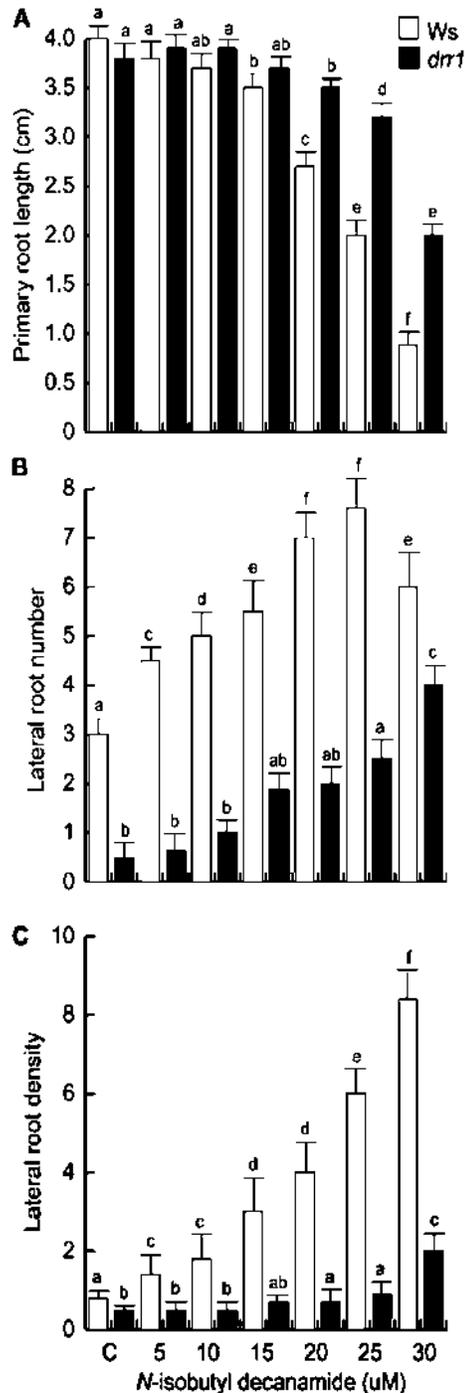
#### *drr1* Mediates the Root Architecture Responses of *Arabidopsis* to *N*-Isobutyl Decanamide

To more clearly define the alterations in the root architectural response to *N*-isobutyl decanamide caused by mutation in *DRR1*, we performed temporal and single-point measurements of primary root length, LR number per plant, and LR density in wild-type and *drr1* mutants treated with varied concentrations of *N*-isobutyl decanamide. Primary root growth was similar in wild-type and *drr1* plants in concentrations of up to 15  $\mu\text{M}$  *N*-isobutyl decanamide, while in concentrations of 20, 25, and 30  $\mu\text{M}$  of this compound, *drr1* primary roots were significantly longer than wild-type plants (Fig. 2A). *N*-isobutyl decanamide increased the number of emerged LR in wild-type plants, while *drr1* plants were resistant to this effect (Fig. 2B). The density of emerged LR dramatically increased in response to alkamide treatment in wild-type plants, but the mutants again showed reduced responses. The most contrasting responses between wild-type and *drr1* plants were observed in 25  $\mu\text{M}$  *N*-isobutyl decanamide, in which wild-type plants showed a highly branched root system harboring second- and third-order LR (Fig. 1, C–E), with a 6-fold increased density of LR (Fig. 2C). In this alkamide concentration, *drr1* mutant plants produced less than 15% of the LR observed in wild-type plants. Interestingly, although *drr1* mutants produced

**Table 1.** Segregation ratio of progeny resulting from crosses between *drr1* mutant and wild-type seedlings

Generation	Phenotype of Progeny		Ratio Obtained, Wild Type: <i>drr1</i>	Ratio Tested, Wild Type: <i>drr1</i>	$\chi^2$
	Many LR (Wild Type)	Few LR ( <i>drr1</i> )			
F1	128	0			
F2	730	260	2.81:1	3:1	0.84

<sup>a</sup>With one degree of freedom and a critical value of 5%, the hypothesis is accepted if the  $\chi^2$  is smaller than 3.841.



**Figure 2.** Effects of *N*-isobutyl decanamide on the root system architecture of wild-type (*Ws*) and *drr1* plants. **A**, Primary root length. **B**, Number of emerged LRs per plant. **C**, LR density expressed as the number of LRs per centimeter. Data were recorded at 12 d after germination. Values shown are means  $\pm$  SD ( $n = 20$ ). Different letters represent means statistically different at the 0.05 level. The experiment was repeated three times with similar results.

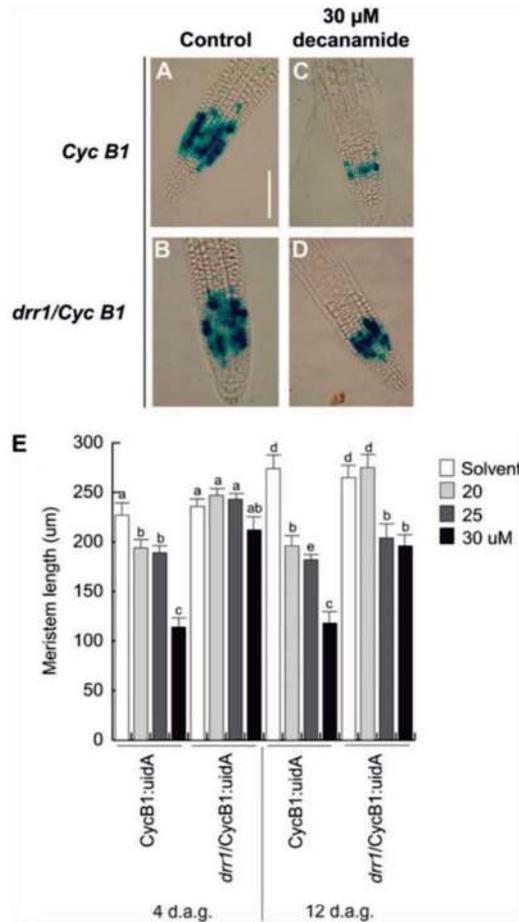
consistently fewer LRs compared with the wild type in most *N*-isobutyl decanamide treatments, exposure to 30  $\mu$ M *N*-isobutyl decanamide caused an 8-fold increase in LR number and a 2-fold increase in LR density (Fig. 2, B and C), indicating that the mutants are not completely insensitive to the alkamide.

#### *drr1* Mutants Are Resistant to Inhibitory Effects of *N*-Isobutyl Decanamide on Cell Division in Primary Root Meristems

An important factor determining primary root growth reduction in wild-type seedlings grown in high *N*-isobutyl decanamide concentrations is the reduction in cell division in the root meristem (López-Bucio et al., 2007). To analyze the cell division responses of *drr1* mutants to alkamide treatment, we crossed *drr1* with a transgenic plant harboring the *CycB1:uidA* construct, which is expressed only in cells in the G2/M phase of the cell cycle and is a marker of mitotic activity (Colón-Carmona et al., 1999). *CycB1:uidA* seedlings and *drr1* seedlings were grown in 0.2 $\times$  MS agar medium supplied with the solvent or with 20, 25, and 30  $\mu$ M *N*-isobutyl decanamide. In both wild-type *CycB1:uidA* and *drr1* mutant seedlings supplied with the solvent only, a patchy pattern of single cells expressing *CycB1:uidA* was observed in the primary root meristem (Fig. 3, A and B). In wild-type plants subjected to treatment with 30  $\mu$ M *N*-isobutyl decanamide, GUS expression in the primary root tip decreased and root hairs were formed in close proximity to the root meristem (Fig. 3C). Interestingly, *CycB1:uidA* expression in the primary root apex of *drr1* seedlings treated with the alkamide was not as much inhibited as in the wild type, and their root meristems were anatomically similar to those of solvent only-treated seedlings (Fig. 3D). Root hair formation close to the root meristem was not observed in *drr1* seedlings treated with the alkamide (Fig. 3D). Next, we quantified the length of the primary root meristems in wild-type and *drr1* plants at 4 and 12 d after germination. At these developmental stages, increased concentrations of *N*-isobutyl decanamide decreased the length of the meristem in wild-type plants, while *drr1* mutants were resistant to this effect (Fig. 3E).

#### *drr1* Is Defective in *N*-Isobutyl Decanamide-Induced LR Primordia Development

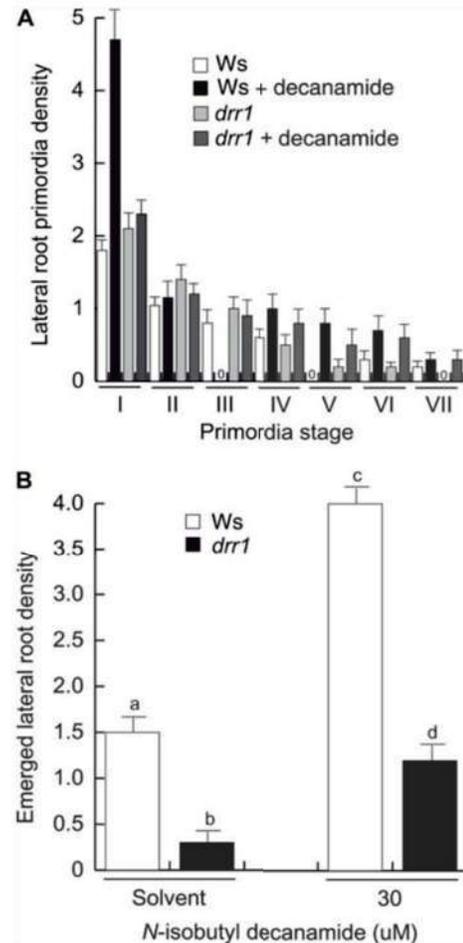
LR formation is a major determinant of root system architecture. Next, we investigated the effects of *N*-isobutyl decanamide on lateral root primordia (LRP) development and LR emergence in wild-type and *drr1* plants. LRP originating in the primary root and emerged LRs were counted at 6 d after germination in plants grown in 0.2 $\times$  MS agar medium supplied with the solvent only or with 30  $\mu$ M *N*-isobutyl decanamide. The developmental stage of each LRP was classified according to Malamy and Benfey (1997; see "Materials and Methods"). In solvent-treated wild-type plants,



**Figure 3.** *CycB1:uidA* expression in transgenic wild-type and *drr1* seedlings. Twelve-hour GUS staining is shown for *CycB1:uidA* primary roots in wild-type and *drr1* *Arabidopsis* seedlings grown on agar-solidified 0.2× MS medium with or without *N*-isobutyl decanamide. A and B, Solvent-treated seedlings. C and D, Plants supplied with 30 μM *N*-isobutyl decanamide. E, Meristem length. Photographs are representative individuals of at least 20 stained seedlings. The experiment was repeated twice with similar results. Bar = 100 μm. d.a.g., Days after germination. [See online article for color version of this figure.]

most LRP remained at an early developmental stage (stage I). Interestingly, *N*-isobutyl decanamide treatment increased both the number of LRP at stage I and the density of emerged LR (Fig. 4). Solvent-treated *drr1* mutants showed similar LRP density to wild-type plants (Fig. 4A) but dramatically decreased density of emerged LR (Fig. 4B), indicating that the mutant is not inherently defective in LRP initiation but rather shows a retardation in the maturation of LRP. When treated with *N*-isobutyl decanamide, *drr1* mutant seedlings did not show an increase in stage I LRP or in LRP emergence observed in wild-type plants (Fig. 4), indicating that the *DRR1* locus is involved in alkamide

responses in the pericycle and during LRP development. Although alkamide treatment significantly increased the density of emerged LR in *drr1* mutants, *drr1* always showed lower LR density than wild-type plants in the different growth conditions (Fig. 4B). These results indicate that *N*-isobutyl decanamide modifies root system architecture both by inducing more pericycle cells to form stage I LRP and by accelerating the emergence of LRP from the primary root to form mature LR. Mutations in *drr1* interfere with both of these processes.



**Figure 4.** Effects of *N*-isobutyl decanamide on wild-type (Ws) and *drr1* LR development. A, LRP stage distribution in 6-d-old primary roots grown on medium supplied with the solvent only or with 30 μM *N*-isobutyl decanamide (indicated as decanamide). B, Emerged LR density in the same experiment. Wild-type and *drr1* seedlings were cleared, and the number and stage of LRP were recorded according to Malamy and Benfey (1997). Values shown are means ± SD ( $n = 15$ ). Different letters represent means statistically different at the 0.05 level. This analysis was repeated twice with similar results.

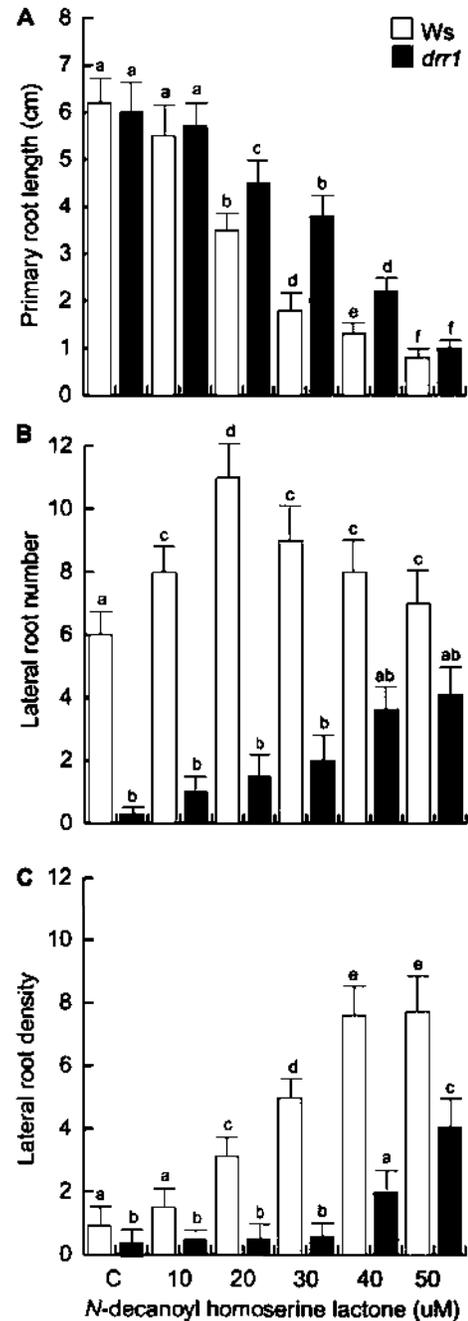
### *drr1* Is Defective in Root Architectural Responses to C10-AHL, a Quorum-Sensing Signal from Bacteria

Previous studies documented that AHLs, a class of alkamide-related quorum-sensing signals from bacteria, modulate root system architecture in *Arabidopsis* (Ortiz-Castro et al., 2008; Von Rad et al., 2008). To determine if *DRR1* is involved in AHL responses, we tested the primary root growth and LR responses of *drr1* seedlings to C10-AHL over a range of concentrations of this compound as compared with wild-type plants. *drr1* had a level of resistance to primary root growth inhibition by C10-AHL over most concentrations tested (Fig. 5A). At 30  $\mu\text{M}$  C10-AHL in wild-type plants, about 60% inhibition occurred, whereas in the mutant, it was about 30%. As previously reported (Ortiz-Castro et al., 2008), C10-AHL stimulated LR formation (Fig. 5B). A dose-dependent effect increasing LR density was observed (Fig. 5C), confirming the positive role of AHLs in LR induction. In contrast, *drr1* mutants showed reduced LR formation when compared with wild-type seedlings over most concentrations of C10-AHL tested (Fig. 5, B and C).

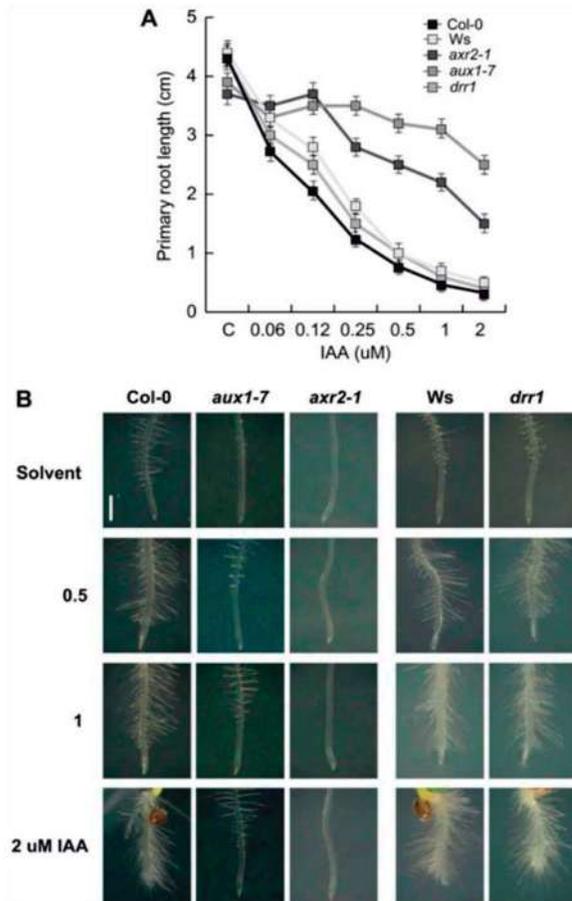
### *drr1* Shows Normal Auxin Responses

Several auxin-related mutants have been characterized in screens for primary root growth resistance to inhibitory amounts of IAA, which display alterations in LR formation (Rogg et al., 2001; Swarup et al., 2001; Fukaki et al., 2002). To determine if *drr1* operates in a genetically defined auxin pathway, wild-type *Arabidopsis* seedlings (ecotype Columbia [Col-0] and *Ws*), *drr1* seedlings, and the auxin-related mutants *aux1-7* and *axr2* were evaluated in primary root growth response assays to IAA. First, to confirm the auxin resistance of auxin-related mutant lines, homozygous *aux1-7* and *axr2-1* seedlings were screened for resistance to IAA based on primary root growth. In these experiments, *aux1-7* and *axr2* were resistant to the inhibition of primary root elongation by IAA when compared with wild-type Col-0 seedlings (Fig. 6A). These mutants also failed to form abundant root hairs at the root tip region in response to increasing IAA concentration in the medium, a phenotype associated with increased auxin resistance (Fig. 6B). In contrast, the auxin response in *drr1* mutants was equally sensitive to IAA than the wild-type (*Ws* ecotype) both in primary root growth assays (Fig. 6A) and toward induction of root hair formation close to the root tip (Fig. 6B). Because *drr1* mutants showed normal root responses to IAA, we conclude that auxin signaling is unaffected in the mutant.

To better understand the role played by auxin in LR formation in wild-type and *drr1* plants, we tested the effects of NAA to activate LR formation in a transfer assay. In these experiments, wild-type and *drr1* plants were first germinated and grown for 7 d in  $0.2\times$  MS agar medium. At day 7 after germination, plants were



**Figure 5.** Effects of C10-AHL on the root system architecture of wild-type (*Ws*) and *drr1* plants. A, Primary root length. B, Number of emerged LRs per plant. C, LR density expressed as the number of LRs per centimeter. Data were recorded at 14 d after germination. Values shown are means  $\pm$  se ( $n = 20$ ). Different letters represent means statistically different at the 0.05 level. The experiment was repeated three times with similar results.

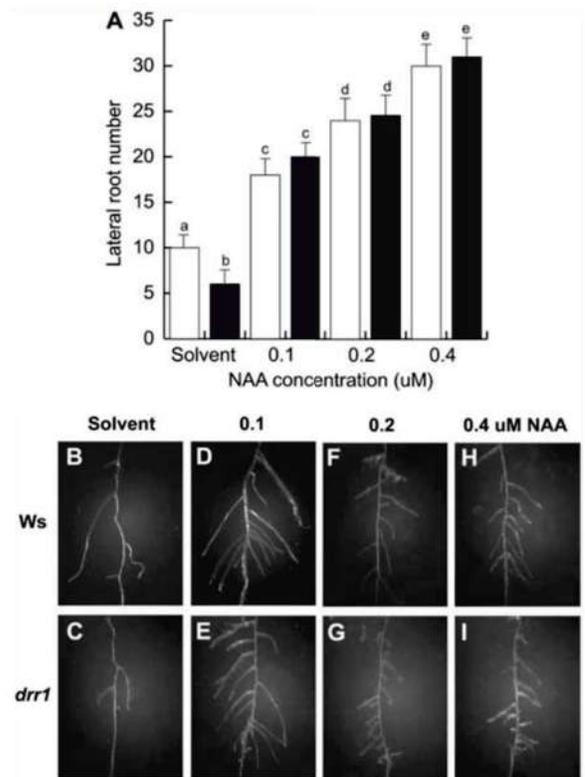


**Figure 6.** Auxin responses in wild-type and *drr1* seedling roots. A, Primary root growth in 12-d-old primary roots of wild-type (Col-0 and Ws), *auxr2-1* and *aux1-7* auxin-resistant mutants, and *drr1* *Arabidopsis* mutants grown on medium supplied with the solvent only or with varied IAA concentrations. B, Morphology of root tips of wild-type and mutant lines exposed to IAA. Seedlings were photographed at 7 d after germination using a digital camera connected to a dissecting microscope. Values shown in A are means  $\pm$  SD ( $n = 30$ ). The experiment was repeated twice with similar results. [See online article for color version of this figure.]

transferred to 0.2 $\times$  MS liquid medium supplied with the solvent or varied concentrations of NAA for an additional 4-d period. At this stage, the number and density of LRs were determined. As shown in Figure 7, NAA treatment caused a dose-response effect in LR formation (Fig. 7A), which was similar between wild-type and *drr1* plants. Both wild-type and *drr1* plants produced highly branched root systems with normal LR growth (Fig. 7, B–I). These results indicate that *drr1* seedlings are not inherently defective in pericycle cell activation to form LRs and are able to correctly sense and respond to auxins.

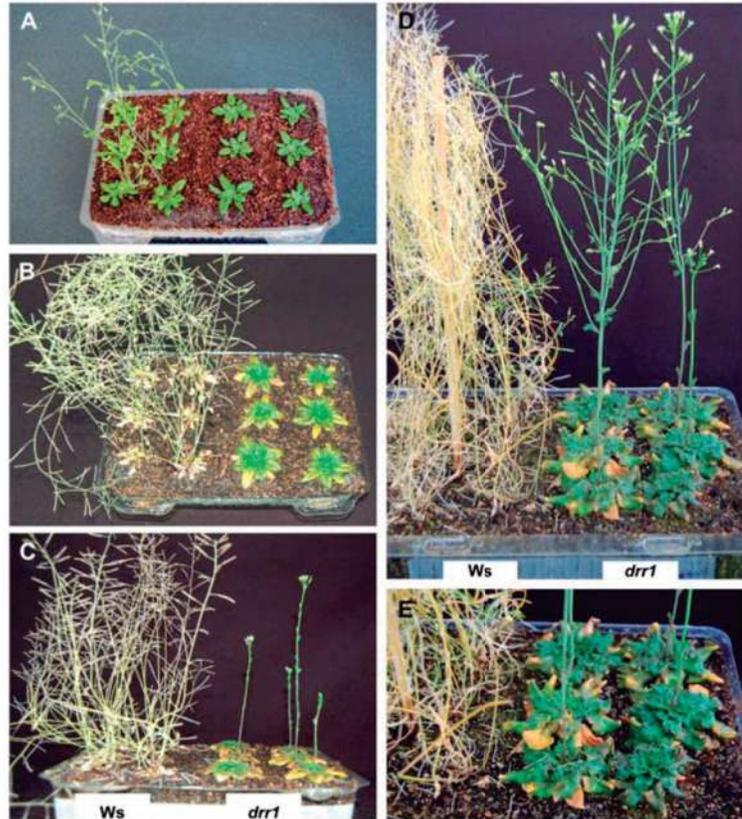
***drr1* Mutants Show Extended Longevity**

To study the role of *DRR1* in plant growth and development, we compared the phenotype of wild-type and homozygous *drr1* plants of the same age that were first germinated and grown for 10 d on 0.2 $\times$  MS agar medium and then transferred to soil. Wild-type and *drr1* plants were grown side by side during their entire life cycle. The young and adult phenotypes of plants are shown in Figure 8. During the first 28 d after transfer, a general delay in the growth of *drr1* mutants was observed, as illustrated by their delay in stem formation (Figs. 8, A and B, and 9A) and significantly decreased rosette size during early stages of vegetative growth (Fig. 9B). At 28 d after transfer, the rosette leaves of wild-type plants had already turned yellow and stem growth ceased, but *drr1* leaves remained



**Figure 7.** Auxin restoration of LR development in *drr1* plants. A, Total LR number per plant in 11-d-old wild-type (Ws) and *drr1* plants that were first grown for 7 d in 0.2 $\times$  MS agar medium and then transferred to 0.2 $\times$  MS liquid medium supplied with the solvent or with varied concentrations of NAA for an additional 4-d growth period. B to I, Representative photographs of wild-type and *drr1* LRs in plants exposed to NAA. Values shown in A are means  $\pm$  SD ( $n = 15$ ). Different letters represent means statistically different at the 0.05 level. This analysis was repeated twice with similar results. [See online article for color version of this figure.]

**Figure 8.** Phenotypes of wild-type and *drr1* plants grown in soil. A to D, Phenotypes of wild-type (*Ws*; left) and *drr1* (right) plants grown side by side at 14, 28, 56, or 84 d after transfer to soil. E, Closeup of rosette leaves at 84 d after transfer. Plants were grown with a 16-h-light/8-h-dark cycle at 22°C in a growth chamber. The retarded leaf senescence in *drr1* was related to the retarded emergence of floral stems and flowering time. [See online article for color version of this figure.]



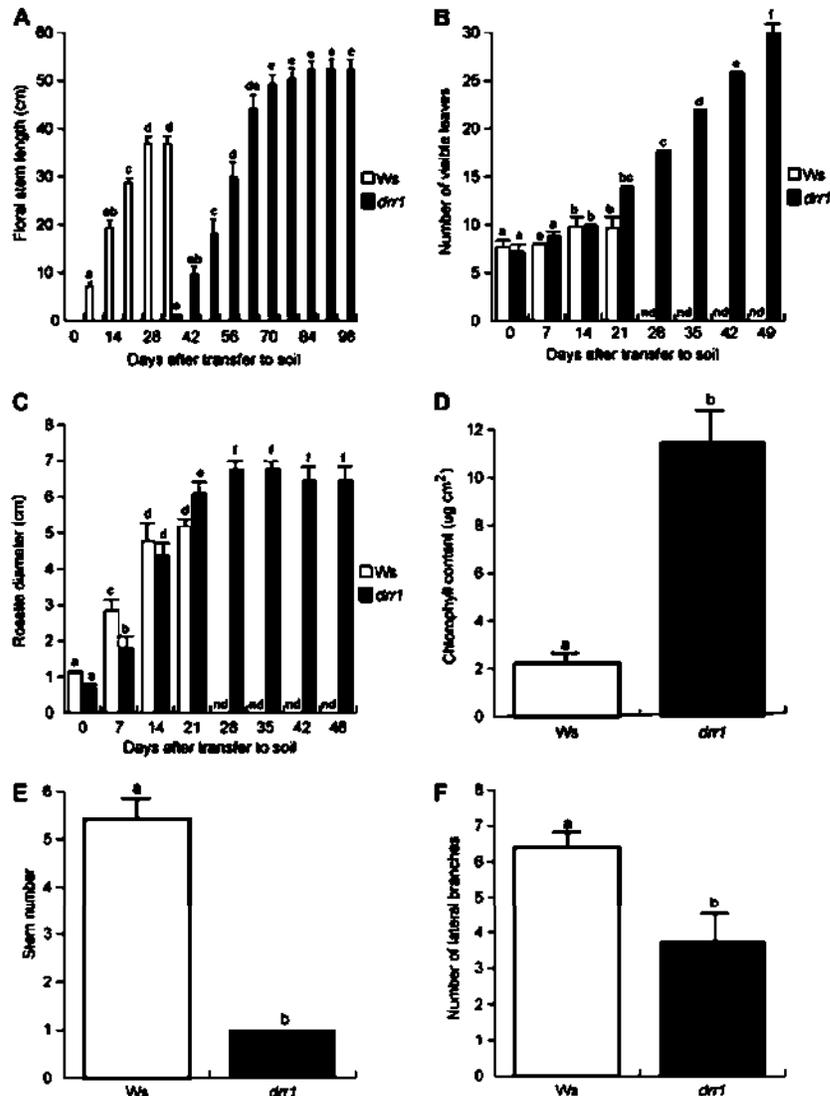
green, and 7 d later, the stems just started to be formed (Figs. 8, A–C, and 9, A and B). At 35 d after transfer, wild-type leaves had turned completely yellow and showed signs of death with drying (Fig. 8C). In contrast, the *drr1* mutant leaves retained a significant amount of chlorophyll and maintained the integrity of the leaf shape (Fig. 8C). The extension of leaf longevity at a whole plant level dramatically increased in *drr1* mutants with time. Delayed flowering was accompanied by the generation of new leaves, increased rosette size, and greater stem length in *drr1* mutants when compared with wild-type plants (Figs. 8, D and E, and 9, A–C). *drr1* sustained chlorophyll production for a longer time period (Fig. 9D). In addition, the shoot architecture of *drr1* mutants was different from that observed in wild-type seedlings, producing only one primary stem with reduced branches, which suggests increased apical dominance in the mutants (Fig. 9, E and F). Aside from the delayed senescence and altered shoot architecture, *drr1* mutants produced fertile flowers that yielded fruits with fully viable seeds (Fig. 8D). We determined that the longevity in *drr1* mutants was extended by approximately 2-fold when compared with wild-type plants, which correlates with a 3- to 4-fold increase in the number of visible leaves and overall increased plant size (Fig. 9, A–C).

#### The *drr1* Mutant Shows Delayed Senescence Symptoms in JA- and Alkamide-Induced Senescence

Leaf senescence is modulated by JA (Schommer et al., 2008). Therefore, the possibility was open that the *drr1* mutant could be deficient in the JA-induced senescence program. We compared the effects of JA and *N*-isobutyl decanamide in wild-type and *drr1* plants in a senescence-induced assay for detached leaves (Fig. 10). In this assay, after 6 d of incubation in water, wild-type detached leaves gradually lost chlorophyll content (Fig. 10, A and C). A deficient senescence program for detached *drr1* plants incubated in water was evident (Fig. 10, B and D). In response to treatments with JA and *N*-isobutyl decanamide, wild-type leaves showed severe senescence symptoms that were reduced in *drr1* mutants (Fig. 10, E–I). Taking together the increased *drr1* longevity in soil and the delaying response to hormone-induced senescence, we conclude that *DRR1* plays an important role in the senescence process modulated by JA and *N*-isobutyl decanamide as well as in age-dependent senescence.

#### *drr1* Is Altered in Jasmonate-Mediated LR Induction

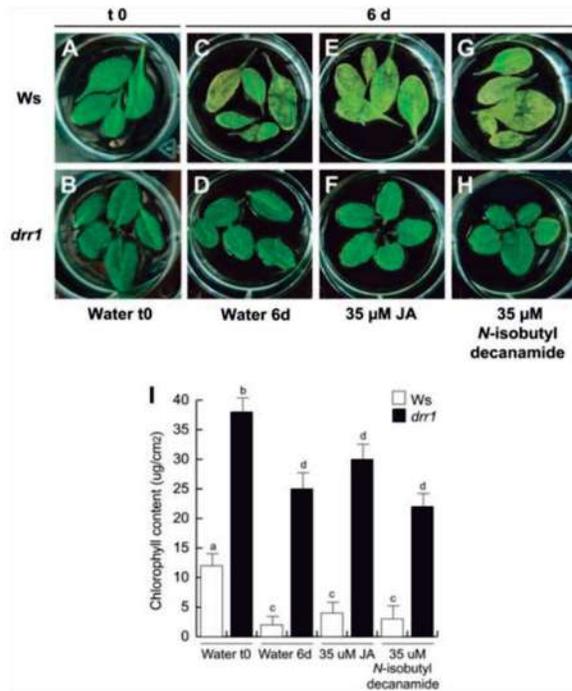
Jasmonates are signals involved in root system architecture modulation (Wasternack, 2007). The in-



**Figure 9.** Age-dependent senescence symptoms and other developmental traits of wild-type (*Ws*) and *drr1* plants grown in soil. **A**, Age-dependent stem size. **B**, Rosette diameter. **C**, Number of visible rosette leaves. **D**, Chlorophyll content in rosette leaves at 28 d after transfer to soil. **E**, Stem number. **F**, Number of stem branches. Plants were grown with a 16-h-light/8-h-dark cycle at 22°C in a growth chamber, and developmental traits were monitored during their entire life cycle. Values shown are means  $\pm$  SD ( $n = 18$ ). Different letters represent means statistically different at the 0.05 level. The experiment was repeated twice with similar results. nd, Not determined.

hibitory effect of methyl jasmonate (MeJA) on primary root growth has been well recognized and widely employed as a useful trait to identify jasmonate-related mutants in *Arabidopsis*. Recently, it has been reported that MeJA also promotes LR formation (Sun et al., 2009). The MeJA dose response of *drr1* in primary root growth and LR formation was compared with *jar1*, a MeJA-insensitive mutant, and wild-type seedlings of the *Ws* and *Col-0* ecotypes; the *Col-0* ecotype provided the genetic background for *jar1* and therefore was included as an additional control. When compared with *Ws* and *Col-0* plants, the *jar1* mutant showed strong resistance to MeJA-induced primary root growth inhibition over most

concentrations tested (Fig. 11A). The primary root growth inhibition in *drr1* was essentially the same as in *Ws* seedlings (Fig. 11A). Interestingly, MeJA, at concentrations of 30 to 45  $\mu$ M, increased emerged LRs in wild-type seedlings and in *jar1* mutants by 70% to 150% (Fig. 11B; Supplemental Fig. S1). In the absence of MeJA, LR formation in *drr1* was significantly reduced compared with wild-type and *jar1* plants. However, *drr1* mutants failed to produce increased numbers of LRs when grown on medium containing a range of concentrations of MeJA (Fig. 11B; Supplemental Fig. S1). Our data reveal that *drr1* encodes a novel genetic locus modulating the effects of MeJA on LR formation.



**Figure 10.** Hormone-dependent senescence symptoms in the *drr1* mutant. Detached leaves of wild-type (Ws) and *drr1* plants were incubated in 2-mL water solutions supplied with the indicated concentrations of compounds. The plates were included in a growth chamber (Percival ARR95L) under dark conditions, and representative photographs of leaves subjected to the different treatments were taken 6 d later (A–H) and chlorophyll determination was performed (I). The experiment included at least three independent samples of five leaves each and was replicated three times with similar results. [See online article for color version of this figure.]

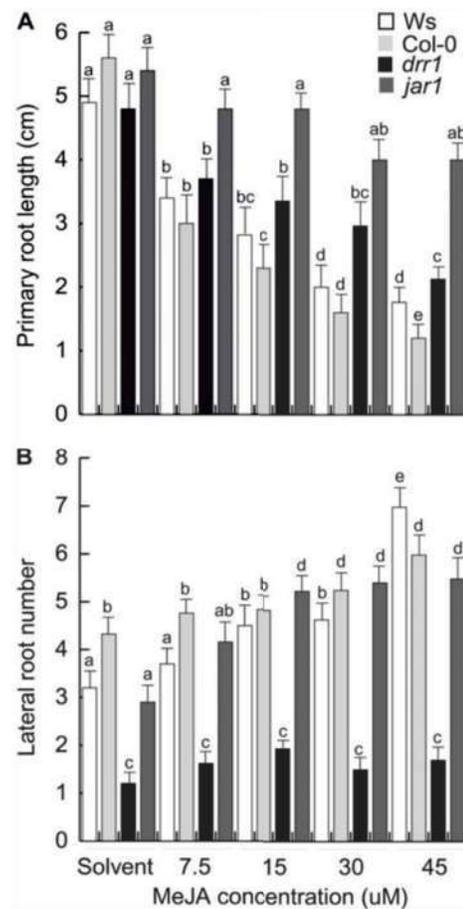
## DISCUSSION

### *drr1* Mutants Define a Locus Involved in Root Architectural Responses to Both Alkamide and AHLs

This report describes the identification and characterization of an *Arabidopsis* mutant that was defective in its root response to *N*-isobutyl decanamide but with additional characteristics, which suggest that alkamides play a role in plant longevity. Our characterization of root architectural responses in the wild type and *drr1* to *N*-isobutyl decanamide provided insights into the genetic mechanisms mediating the responses to alkamides. While *N*-isobutyl decanamide inhibited primary root growth and promoted LR formation in wild-type seedlings, resistance to the repressive effect of this alkamide on primary root growth and the failure to increase LR formation typified the *drr1* phenotype (Figs. 1 and 2).

Detailed cellular analysis of wild-type and *drr1* plants showed that the mutants sustained almost normal root meristematic activity when grown under

inhibitory concentrations of *N*-isobutyl decanamide, as revealed by cell counts and *CycB1:uidA* expression in the primary root meristem (Fig. 3). Interestingly, the typical increase in LR primordia initiation and LR emergence observed in wild-type plants treated with the alkamide was reduced in *drr1* (Fig. 4). Several types of reported experimental evidence suggested that conditions that reduce primary root meristematic activity, including destruction of the primary root meristem by cell ablation and physical decapitation of the root tip, elicit an increase in LR number (Tsugeki and Fedoroff, 1999). Our findings that *drr1* mutants grown in medium lacking alkamides sustain normal primary root growth but reduced LR formation (Figs. 1 and 2) indicate that LR proliferation in response to *N*-isobutyl decanamide is not a direct consequence of



**Figure 11.** Effects of JA on primary root growth and LR development in wild-type (Ws and Col-0) and mutant (*drr1* and *jar1*) lines. A, Primary root length. B, Number of emerged LRs per plant. Data were recorded at 12 d after germination. Values shown are means  $\pm$  SD ( $n = 20$ ). Different letters represent means statistically different at the 0.05 level. The experiment was repeated three times with similar results.

primary root growth inhibition but rather suggest a positive effect of the alkamide on pericycle cells to produce more LRP (Fig. 4).

Many bacterial species use small molecule signaling to communicate with each other and to coordinate their growth activities, a process commonly referred to as quorum sensing (Taga and Bassler, 2003; Reading and Sperandio, 2006). Diverse gram-negative bacteria produce AHLs, and these compounds contain a conserved HL ring and an *N*-linked acyl side chain. Our previous work indicated that saturated medium (C8–C14)-chained AHL compounds showed a dose-dependent effect on root architecture, inhibiting primary root growth and promoting LR formation (Ortiz-Castro et al., 2008). In this work, we used the *drr1* mutant to determine whether alkamides and AHLs could be perceived by similar genetic mechanisms. We show that C10-AHL inhibited primary root growth and promoted LR formation in *Arabidopsis* wild-type seedlings (Fig. 5). *drr1* mutants showed reduced sensitivity to both *N*-isobutyl decanamide and C10-AHL, indicating a potential genetic interaction in plant responses to alkamides and AHLs in roots. These results also suggest that plants have evolved the capacity to sense AHLs in order to activate developmental responses.

Several reports indicate that bacteria commonly associated with plants are capable to produce a variety of AHLs (Cha et al., 1998; Elasmri et al., 2001; Khmel et al., 2002; D'Angelo-Picard et al., 2005). Several strains of *Pseudomonas* have been studied for their ability to colonize plant-related niches, such as the rhizosphere (i.e. *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, and *P. putida*), where they can act as plant growth-promoting rhizobacteria by antagonizing plant-deleterious microorganisms and through the production of traits that directly influence plant disease resistance and growth (Venturi, 2006). The rhizospheric *P. putida* plant beneficial strains WCS358 and IsoF produce 3-oxo-C<sub>12</sub>-AHL, whereas in the rhizosphere-colonizing biocontrol *P. fluorescens* strain F<sub>13</sub>, the production of three AHL molecules, including C10-AHL, has been reported (Laue et al., 2000; Venturi, 2006). Interestingly, C10-AHL and C12-AHL seem to be also produced in the nitrogen-fixing bacterial symbiont *Sinorhizobium meliloti* (Marketon et al., 2002; Teplitski et al., 2003). The marked resistance of *drr1* to C10-AHL on root development opens new possibilities to identify novel genetic determinants involved in plant-bacteria interactions. Furthermore, the *drr1* mutant can be used as a tool to identify novel plant growth-promoting bacterial strains, which could modulate root system architecture through AHL production.

Two recent reports suggested that auxin signaling might be involved in plant responses to AHLs (Mathesius et al., 2003; Von Rad et al., 2008). Auxins are signaling molecules that regulate the asymmetric pericycle cell divisions and thereby influence the patterning of newly initiated LRP. Thus, the possibility was open that altered auxin responses could be re-

sponsible for reduced LR formation in *drr1* mutants. Our results, however, showed that *drr1* mutants are not resistant to IAA or NAA treatments in terms of primary root growth inhibition or LR formation (Figs. 6 and 7), indicating that *DRR1* might not be directly connected to the auxin response pathway to modulate plant growth and development. These results are in agreement with our previous research showing that both alkamides and AHLs modulate root system architecture, likely through auxin-independent signaling mechanisms (Ramírez-Chávez et al., 2004; Campos-Cuevas et al., 2008; Ortiz-Castro et al., 2008).

#### ***DRR1* Plays a Role in Senescence-Related Processes**

Senescence is a developmental process that limits the longevity of an organism. Genetic studies of longevity mutants have also suggested that some common mechanisms, such as alterations in energy metabolism and oxidative damage, might play a role in determining life span in animals as divergent as nematodes, *Drosophila*, and mammals (Lin et al., 1998; Parkes et al., 1998). Plants also undergo a distinctive senescence process at the organ and/or organism level. A number of studies have provided evidence suggesting that leaf senescence is an active process controlled by a genetic program (Woo et al., 2001, 2002; Schommer et al., 2008). However, our understanding of how senescence and longevity are controlled at the whole plant level remains quite limited. Our results suggest that LR development and age-dependent plant senescence are directly connected through *DRR1*. Obvious alterations were seen in *drr1* plants grown in soil under long days (16-h-light/8-h-dark conditions). In *drr1* plants, leaf senescence was delayed by about 4 to 5 weeks when compared with wild-type plants (Figs. 8 and 9). The extended longevity of leaves was related to an extended growth period as well as to slower onset and/or progression of senescence after the maturation stage. The reduced growth observed at early stages of development in *drr1* mutants opens the possibility that it may contribute to extended longevity. Consistent with this hypothesis, we observed that reduced LR formation was not caused by the failure of the pericycle to produce these structures but by the retarded development of LRP to emerge from the primary root (Fig. 4). In this way, the *drr1* mutation shows a senescence character that differs from the delayed leaf senescence phenotype observed in the *oresara* (*ore*) and *teosinte branched/cycloidea/PCF* (*tcp*) mutants described previously (Woo et al., 2001, 2002; Schommer et al., 2008). In *ore* mutants, the retarded senescence phenotype seems to be specifically observed in leaves. For instance, the leaf longevity in *ore9-1* was extended only by about 27%, without affecting other developmental traits such as flowering time and/or plant size (Woo et al., 2001). To our knowledge, no LR phenotypes have been reported for leaf senescence mutants such as the *ore* and *tcp* lines. Interestingly, the *drr1* mutants also show that

plants that bolt and senesce late produce more leaves and increase in size (Figs. 8 and 9), which could lead to potential agricultural applications. Together, our findings suggest that *DRR1* may function normally as a positive regulator of senescence in *Arabidopsis*, limiting longevity at the whole plant level. Because the *drr1* mutation affects a wide variety of age-dependent developmental and senescence responses (Fig. 10), *DRR1* may function upstream in the regulatory cascade of senescence pathways.

#### *drr1* Mutants Reveal Cross Talk between Alkamide and Jasmonate in LR Formation

Cross-resistance of mutants to multiple hormones is well documented (Wilson et al., 1990; Hobbie and Estelle, 1994; Tiryaki and Staswick, 2002) and suggests that the action of hormones is coordinated by common intermediates or modulators. Several phytohormones are involved in leaf senescence, including ethylene, cytokinin, and JA (Schommer et al., 2008). High concentrations of *N*-isobutyl decanamide have been found to induce callus formation in leaves and in roots (López-Bucio et al., 2007). Although not explicitly tested here, preliminary information shows that *drr1* plants are also resistant to callus formation (data not shown). The proliferative growth activity elicited by *N*-isobutyl decanamide on callus formation in leaves and LR formation in roots was previously shown to be decreased or even absent in *Arabidopsis* mutants lacking one, two, or three of the putative cytokinin receptors *CRE1*, *AHK2*, and *AHK3* (López-Bucio et al., 2007). The triple cytokinin receptor mutant *cre1-12/ahk2-2/ahk3-3* was particularly insensitive to high alkamide concentrations in terms of developmental alterations, indicating that *N*-isobutyl decanamide requires, at least in part, a functional cytokinin-signaling pathway to control meristematic activity and differentiation processes. However, the primary root growth response of the *drr1* mutants to kinetin, a highly active cytokinin in modulating root development, was similar to that observed in wild-type plants (Supplemental Fig. S2A), indicating that *drr1* is not resistant to root inhibition by cytokinin. However, we cannot exclude the possibility that cross talk between alkamide and cytokinin responses may account for the increased longevity and/or reduced senescence of *drr1* mutants. Abscisic acid and ethylene are two growth regulators also involved in senescence; *DRR1* mutation rendered the *drr1* seedlings more sensitive to the primary root growth inhibitory effect of low abscisic acid concentrations than wild-type seedlings (Supplemental Fig. S2B), whereas the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid similarly inhibited growth (Supplemental Fig. S2C).

The plant hormone JA plays a key role in the environmental stress responses and developmental processes of plants. A recent report has revealed an important role of JA in LR development. In such work (Sun et al., 2009), it was shown that exogenous MeJA

promotes LR formation in *Arabidopsis* wild-type plants but not in *anthranilate synthase1* mutants, leading to the proposal that localized auxin biosynthesis in response to jasmonate could be important for fine-tuned modulation of LR formation. Our detailed morphological comparison among wild-type, *drr1*, and *jar1* plants indicated that, when grown on JA-free medium, LR development in *drr1* was significantly lower than in wild-type or *jar1* plants. Interestingly, while JA application led to increased LR numbers in wild-type and *jar1* plants, it failed to activate LR formation in *drr1* (Fig. 11; Supplemental Fig. S1). Comparison of the primary root response to JA also showed that *drr1* behaves essentially different from *jar1*, which was very insensitive to primary root growth inhibition by JA but responded similarly to wild-type plants in LR induction by this compound. Therefore, *drr1* shows alkamide resistance in terms of primary and LR growth, whereas it has resistance to jasmonate in LR formation only. Taking into account these results, it is tempting to speculate that further cross talk of alkamide signaling with phytohormones such as cytokinins or jasmonates might vary in different tissues or in a developmental context, possibly explaining why *drr1* mutants exhibit no defects in primary root growth inhibition assays to these phytohormones.

In summary, we have provided evidence that alkamide and AHL signaling are under genetic control in *Arabidopsis* and that normal responses to these signals are important for plant development. Elucidation of the genetic identity of the *DRR1* product is critical to understand the molecular mechanisms underlying the distinct effects of these and other small lipid signals on root architecture adjustment and their role in plant longevity.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant Material and Growth Conditions

*Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) wild-type plants (Col-0 and/or *Ws* ecotypes), the transgenic line *CyCB1::uidA* (Colón-Carmona et al., 1999), and the mutant lines *jar1* (Tiryaki and Staswick, 2002), *axr2-1* (Timpte et al., 1994), and *aux1-7* (Pickett et al., 1990) were used for all experiments. Seeds were surface sterilized with 95% (v/v) ethanol for 5 min and 20% (v/v) bleach for 7 min. After five washes with sterile distilled water, seeds were germinated and grown on agar plates containing 0.2× MS medium (Murashige and Skoog, 1962). MS medium (MS basal salts mixture; catalog no. M5524) was purchased from Sigma. The suggested formulation is 4.3 g L<sup>-1</sup> salts for a 1× concentration of medium; we used 0.9 g L<sup>-1</sup>, which we consider and refer to as 0.2× MS. This medium lacks amino acids and vitamins. Phytagar (micro-propagation grade) was purchased from Phytotechnology. Plants were placed in a plant grown chamber (Percival Scientific AR-951) with a photoperiod of 16 h of light and 8 h of darkness, light intensity of 100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, and temperature of 22°C.

### Mutant Isolation Procedure

T-DNA lines (*Ws*; Krysan et al., 1999) were provided by the Ohio *Arabidopsis* Seed Stock Center. Seeds were surface sterilized and plated on 0.2× MS medium supplied with 30 μM *N*-isobutyl decanamide. A number of approximately 25,000 T-DNA lines were screened for reduced LR formation

by placing seeds on nutrient agar plates (20–25 seeds per plate). The seeds were distributed in two rows on the agar surface at a density of one seed per centimeter, stratified at 4°C for 48 h, and then incubated at 22°C. Fourteen days after germination, *N*-isobutyl decanamide-treated plants have a short primary root and a large number of LRs are formed. Putative mutants with long primary roots and a reduced number of LRs were selected, transferred to soil, and allowed to self-fertilize. Homozygous M3 seeds were rescreened for sustained primary root growth in medium supplied with 30  $\mu$ M *N*-isobutyl decanamide, transferred to soil, and backcrossed three times to the wild type (Ws) to remove unlinked mutations.

### Genetic Analysis of *drr1* Mutants

To determine the segregation pattern of the *drr1* phenotype, 990 F2 seedlings derived from the cross *drr1*  $\times$  Ws were analyzed in MS 0.2 $\times$  agar medium supplied with 30  $\mu$ M *N*-isobutyl decanamide. A typical 3:1 recessive segregation was observed for the wild-type/*drr1* phenotype. Cosegregation of primary root growth resistance and increased longevity was further confirmed in *drr1* seedlings grown in soil.

### Hormone Treatments

For all experiments, MS 0.2 $\times$  nutrient medium was supplemented with *N*-isobutyl decanamide, C10-AHL, or the indicated phytohormones. Ethanol-dissolved compounds were added to cooled (50°C) molten medium and poured onto plates. Control plates were supplied with the greatest concentration of solvent used in the treatments. For hormone-induced senescence, leaves at 22 d after leaf emergence were detached and floated on sterilized water in the presence or absence of 35  $\mu$ M JA or 35  $\mu$ M *N*-isobutyl decanamide for 6 d. All treatments were performed at 22°C under dark conditions. Chemicals were purchased from Sigma Chemical.

### Analysis of Growth and Statistical Analysis

Growth of primary roots was registered using a ruler. LR number and LR density were determined by counting the LRs present in the primary root from the tip to the root/stem transition. LR density was determined by dividing the LR number by the primary root length and expressed as LR density per centimeter. The length of the meristem was determined as the distance between the quiescent center and the cell file where cells started to elongate. For all experiments, the overall data were statistically analyzed in the SPSS 10 program (SPSS). Univariate and multivariate analyses with a Tukey's posthoc test were used for testing differences in growth and root developmental responses in wild-type and mutant lines. Different letters are used to indicate means that differ significantly ( $P < 0.05$ ).

### Determination of Developmental Stages of LRP

LRP were quantified at day 4 after germination. Seedling roots were first cleared to enable LRP at early stages of development to be visualized and counted. Each LR primordium was classified according to its stage of development as reported by Malamy and Benfey (1997). The developmental stages are as follows. Stage I, LRP initiation; in the longitudinal plane, approximately eight to 10 "short" pericycle cells are formed. Stage II, the formed LR primordium is divided into two layers by a periclinal division. Stage III, the outer layer of the primordium divides periclinaly, generating a three-layer primordium. Stage IV, LR primordium with four cell layers. Stage V, the LR primordium is midway through the parent cortex. Stage VI, the LR primordium has passed through the parent cortex layer and has penetrated the epidermis. It begins to resemble the mature root tip. Stage VII, the LR primordium appears to be just about to emerge from the parent root.

### Chlorophyll Determination

We used leaves from wild-type (Ws) and *drr1* plants germinated and grown on 0.2 $\times$  MS medium and then transferred to soil for 35 d. Wild-type leaves were yellowed as a result of age-dependent senescence; *drr1* leaves remained green at this stage. We used a hand-held chlorophyll meter (CCM-200; Opti-Sciences) to calculate a chlorophyll content index based on absorbance measurements at 660 and 940 nm on 15 independent leaves. Five separate measurements with the hand-held meter were made on each

leaf. Chlorophyll content was finally determined as described previously (Richardson et al., 2002).

### Histochemical Analysis of GUS Activity

Transgenic plants that express the *uidA* reporter gene (Jefferson et al., 1987) were stained in 0.1% 5-bromo-4-chlorium-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide in phosphate buffer (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1 M, pH 7) with 2 mM potassium ferrocyanide and 2 mM potassium ferricyanide for 12 h at 37 °C. Plants were cleared and fixed as described previously by Malamy and Benfey (1997). The processed roots were included in glass slips and sealed with commercial nail varnish. For each marker line and for each treatment, at least 10 transgenic plants were analyzed.

### Microscopy

The *Arabidopsis* root system was analyzed with a stereoscopic microscope (MZ6; Leica Microsystems). Total LRs were counted at 30 $\times$  magnification. Primary root meristems were analyzed in semipermanent preparations of cleared roots using a composed microscope (AxioStar Zeiss Plus; Carl Zeiss) at 100 $\times$  or 400 $\times$  magnification. Images were captured with a Cyber-shot DSC-S75 digital camera (Sony Electronics) adapted to the microscope and processed with the Axio Vision 4AC software (Carl Zeiss).

### Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

**Supplemental Figure S1.** *drr1* shows defective LR formation in response to JA treatment.

**Supplemental Figure S2.** Effects of kinetin, abscisic acid, and ethylene on primary root growth in wild-type and *drr1* plants.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Peter Doerner, Angel Arturo Guevara-García, and Plinio Guzmán for kindly providing us with seeds of transgenic and mutant lines. We gratefully acknowledge Jorge Molina-Torres and Enrique Ramírez-Chávez for kindly providing us *N*-isobutyl decanamide.

Received October 24, 2009; accepted January 20, 2010; published January 27, 2010.

### LITERATURE CITED

- Boerjan W, Cervera MT, Delarue M, Beekman T, DeWitte W, Bellini C, Caboche M, Van Onckelen H, Van Montagu M, Inzé D (1995) *Superroot*, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. *Plant Cell* 7: 1405–1419
- Campos-Cuevas JC, Pelagio-Flores R, Raya-González J, Méndez-Bravo A, Ortiz-Castro R, López-Bucio J (2008) Tissue culture of *Arabidopsis thaliana* explants reveals a stimulatory effect of alkaloids on adventitious root formation and nitric oxide accumulation. *Plant Sci* 174: 165–173
- Casimiro I, Beekman T, Graham N, Bhalerao R, Zhang H, Casero P, Sandberg G, Bennett M (2003) Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends Plant Sci* 8: 165–171
- Casimiro I, Marchant A, Bhalerao RP, Beekman T, Dhooge S, Swarup R, Graham N, Inzé D, Sandberg G, Casero PJ, et al (2001) Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* 13: 843–852
- Celenza JL, Grisafi PL, Fink GR (1995) A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* 9: 2131–2142
- Cha C, Gao P, Chen YC, Shaw PD, Farrand SK (1998) Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by Gram-negative plant-associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 11: 1119–1129
- Chapman KD (2004) Occurrence, metabolism, and prospective functions of *N*-acylethanolamines in plants. *Prog Lipid Res* 43: 309–327
- Colón-Carmona A, You R, Haimovich-Gal T, Doerner P (1999) Spatio-

- temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J* **20**: 503–508
- D'Angelo-Picard C, Faure D, Penot I, Dessaux Y (2005) Diversity of *N*-acyl homoserine lactone-producing and -degrading bacteria in soil and tobacco rhizosphere. *Environ Microbiol* **7**: 1796–1808
- De Smet I, Vaneste S, Inzé D, Beeckman T (2006) Lateral root initiation or the birth of a new meristem. *Plant Mol Biol* **60**: 871–887
- Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B (1993) Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* **119**: 71–84
- Dubrovsky JG, Rost TL, Colón-Carmona A, Doerner P (2001) Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **214**: 30–36
- Dubrovsky JG, Sauer M, Napsucially-Mendivil S, Ivanchenko MG, Friml J, Shiskova S, Celenza J, Benkova E (2008) Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 8790–8794
- Elasri M, Delorme S, Lemanceau P, Steward G, Laue B, Glickmann E, Oger PM, Dessaux Y (2001) Acyl-homoserine lactone production is more common among plant-associated *Pseudomonas* spp. than among soil borne *Pseudomonas* spp. *Appl Environ Microbiol* **7**: 1796–1808
- Fukaki H, Okushima Y, Tasaka M (2007) Auxin-mediated lateral root formation in higher plants. *Int Rev Cytol* **256**: 111–137
- Fukaki H, Tameda S, Masuda H, Tasaka M (2002) Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the *solitary root/IAA14* gene of *Arabidopsis*. *Plant J* **29**: 153–168
- Fukaki H, Tasaka M (2009) Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Mol Biol* **69**: 383–396
- Gil P, Dewey E, Friml J, Zhao Y, Snowden KC, Putrill J, Palme K, Estelle M, Chory J (2001) BIG: a calossin-like protein required for polar auxin transport in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **15**: 1985–1997
- Himanen K, Boucheron E, Vaneste S, de Almedida-Engler J, Inzé D, Beeckman T (2002) Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell* **14**: 2339–2351
- Hobbie L, Estelle M (1994) Genetic approaches to auxin action. *Plant Cell Environ* **17**: 525–540
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusion:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile fusion marker in higher plants. *EMBO J* **6**: 3901–3907
- Khmel IA, Veselova MA, Metlitskaya AZ, Klein S, Lipasova VA, Mayatskaya AV, Chernin LS (2002) Synthesis of signaling *N*-acyl-homoserine-lactone participating in quorum sensing regulation in rhizospheric and soil-borne bacteria *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Russ J Genet* **38**: 467–469
- King JJ, Stimart DP, Fisher RH, Bleecker AB (1995) A mutation altering auxin homeostasis and plant morphology in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **7**: 2023–2037
- Krysan PJ, Young JC, Sussman MR (1999) T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**: 2283–2290
- Laue BE, Jiang Y, Chhabra SR, Jacob S, Stewart GS, Hardman A, Downie JA, O'Gara F, Williams P (2000) The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin *N*-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl)-homoserine lactone, via HdtS, a putative novel *N*-acyl-homoserine lactone synthase. *Microbiology* **146**: 2469–2480
- Laurerio-Rosario S, Silva A, Parente J (1996) Alkamides from *Cissampelos glaberrima*. *Planta Med* **62**: 376–377
- Lin YJ, Seroude L, Benzer S (1998) Extended life-span and stress resistance in the *Drosophila* mutant *methuselah*. *Science* **282**: 943–946
- Lincoln C, Britton JH, Estelle M (1990) Growth and development of the *axr1* mutant of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2**: 1071–1080
- López-Bucio J, Acevedo-Hernández G, Ramírez-Chávez E, Molina-Torres J, Herrera-Estrella L (2006) Novel signals for plant development. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 523–529
- López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 280–287
- López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Pérez-Torres A, Ramírez-Pimentel JG, Sánchez-Calderón L, Herrera-Estrella L (2005) Root architecture. In C Turnbull, ed, *Plant Architecture and Its Manipulation*. Blackwell Annual Review Series. Blackwell, Oxford, pp 181–206
- López-Bucio J, Millán-Godínez M, Méndez-Bravo A, Morquecho-Contreras A, Ramírez-Chávez E, Molina-Torres J, Pérez-Torres A, Higuchi M, Kakimoto T, Herrera-Estrella L (2007) Cytokinin receptors are involved in alkamide regulation of root and shoot development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **145**: 1703–1713
- Malamy JF (2005) Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell Environ* **28**: 67–77
- Malamy JF, Benfey PN (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**: 33–44
- Marketon MM, Gronquist MR, Eberhard A, González JE (2002) Characterization of the *Sinorhizobium meliloti* *sinR/sinI* locus and the production of novel *N*-acyl homoserine lactones. *J Bacteriol* **184**: 5686–5695
- Mathesius U, Mulders S, Gao MS, Teplitski M, Caetano-Anoles G, Rolfe BG, Bauer WD (2003) Extensive and specific response of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 1444–1449
- Morquecho-Contreras A, López-Bucio J (2007) Cannabinoid-like signaling and other new developmental pathways in plants. *Int J Plant Dev Biol* **1**: 34–41
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* **15**: 473–497
- Nibau C, Gibbs DJ, Coates JC (2008) Branching out in new directions: the control of root architecture by lateral root formation. *New Phytol* **179**: 595–614
- Ortiz-Castro R, Martínez-Trujillo M, López-Bucio J (2008) *N*-Acyl-L-homoserine lactones: a class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* **31**: 1497–1509
- Parkes TL, Elia AJ, Dickinson D, Hilliker AJ, Phillips JP, Boulianne GL (1998) Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motoneurons. *Nat Genet* **19**: 171–174
- Parsek MR, Val DL, Hanzelka BL, Cronan JE, Greenberg EP (1999) Acyl-homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 4360–4365
- Pearson JP, Gray KM, Passador L, Tucker KD, Eberhard A, Iglewski BH, Greenberg EP (1994) Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 197–201
- Pearson JP, Van Delden C, Iglewski BH (1999) Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol* **181**: 1203–1210
- Péret B, de Rybel B, Casimiro I, Benková E, Swarup R, Laplace L, Beeckman T, Bennett M (2009) *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci* **14**: 399–408
- Pickett FB, Wilson AK, Estelle M (1990) The *aux1* mutation of *Arabidopsis* confers both auxin and ethylene resistance. *Plant Physiol* **94**: 1462–1466
- Ramírez-Chávez E, López-Bucio J, Herrera-Estrella L, Molina-Torres J (2004) Alkamides isolated from plants promote growth and alter root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **134**: 1058–1068
- Reading NC, Sperandio V (2006) Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **254**: 1–11
- Richardson AD, Duigan SP, Berlyn GP (2002) An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytol* **153**: 185–194
- Ríos-Chávez P, Ramírez-Chávez E, Armenta-Salinas C, Molina-Torres J (2003) *Acemella radicans* var. *radicans*: in vitro culture establishment and alkamide content. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **39**: 37–41
- Rogg LE, Lasswell J, Bartel B (2001) A gain-of-function mutation in *IAA28* suppresses lateral root development. *Plant Cell* **13**: 465–480
- Schommer C, Palatnik J, Aggarwal P, Chetelat A, Cubas P, Farmer E, Nath U, Weigel D (2008) Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. *PLoS Biol* **6**: 1991–2001
- Schuegger R, Ihring A, Gantner S, Bahnweg G, Knappe C, Vogg G, Hutzler P, Schmid M, Van Breusegem F, Eber L, et al (2006) Induction of systemic resistance in tomato by *N*-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant Cell Environ* **29**: 909–918
- Scott RA, Well J, Le PT, Williams P, Fray RG, Von Bodmann SB, Savka MA (2006) Long-and-short chain plant-produced bacterial *N*-acyl-homoserine lactones become components of phyllosphere, rhizosphere and soil. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 227–239
- Sun J, Xu Y, Ye S, Jiang H, Chen Q, Liu F, Zhou W, Chen R, Li X, Tietz O, et al (2009) *Arabidopsis* *ASA1* is important for jasmonate-mediated regulation of auxin biosynthesis and transport during lateral root formation. *Plant Cell* **21**: 1495–1511
- Swarup R, Friml J, Marchant A, Ljung K, Sandberg G, Palme K, Bennett M (2001) Localization of the auxin permease *AUX1* suggests two

- functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes Dev* **15**: 2648–2653
- Taga ME, Bassler BL** (2003) Chemical communication among bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 14549–14554
- Teplitski M, Eberhard A, Gronquist MR, Gao M, Robinson JB, Bauer W** (2003) Chemical identification of *N*-acyl homoserine lactone quorum-sensing signals produced by *Sinorhizobium meliloti* strains in defined medium. *Arch Microbiol* **180**: 494–497
- Timpte C, Wilson AK, Estelle M** (1994) The *axr2-1* mutation of *Arabidopsis thaliana* is a gain-of-function mutation that disrupts an early step in auxin response. *Genetics* **138**: 1239–1249
- Tiryaki I, Staswick P** (2002) An *Arabidopsis* mutant defective in jasmonate response is allelic to the auxin-signaling mutant *axr1*. *Plant Physiol* **130**: 887–894
- Tsugeki R, Fedoroff NV** (1999) Genetic ablation of root cap cells in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 12941–12946
- Venturi V** (2006) Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 274–291
- Von Rad U, Klein I, Dobrev PI, Kottova J, Zazimalova E, Fekete A, Hartmann A, Schmitt-Kopplin P, Dürner J** (2008) Response of *Arabidopsis thaliana* to *N*-hexanoyl-DL-homoserine lactone, a bacterial quorum sensing molecule produced in the rhizosphere. *Planta* **229**: 73–85
- Wang X** (2004) Lipid signaling. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 329–336
- Wang YS, Shresta R, Kilaru A, Wiant W, Enables BJ, Chapman KD, Blancaflor E** (2006) Manipulation of *Arabidopsis* fatty acid amide hydrolase expression modifies plant growth and sensitivity to *N*-acyl ethanolamines. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 12197–12202
- Wasternack C** (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot (Lond)* **100**: 681–697
- Wilson AK, Pickett FB, Turner JC, Estelle M** (1990) A dominant mutation in *Arabidopsis* confers resistance to auxin, ethylene and abscisic acid. *Mol Gen Genet* **222**: 377–383
- Woo HR, Chung KM, Park JH, Oh SA, Ahn T, Hong SH, Jang SK, Nam HG** (2001) ORE9, an F-box protein that regulates leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 1779–1790
- Woo HR, Goh CH, Park JH, Teysseidier B, Kim JH, Park YI, Nam HG** (2002) Extended leaf longevity in the *ore4-1* mutant of *Arabidopsis* with a reduced expression of a plastid ribosomal protein gene. *Plant J* **31**: 331–340
- Woodward AW, Bartel B** (2005) Auxin: regulation, action and interaction. *Ann Bot (Lond)* **95**: 707–735
- Worrall D, Ng CKY, Hetherington AM** (2003) Sphingolipids, new players in plant signaling. *Trends Plant Sci* **8**: 317–320
- Wymann MP, Schneider R** (2008) Lipid signaling in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 163–176

## 6.2 CAPITULO II

## Cannabinoid-Like Signaling and Other New Developmental Pathways in Plants

Alina Morquecho-Contreras • José López-Bucio\*

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio B3, Ciudad Universitaria. C. P. 58030 Morelia, Michoacán, México

Corresponding author: \*jbucio@zeus.umich.mx

### ABSTRACT

Plant growth and development depend on the interplay of a number of chemical regulators. Traditionally, six groups or classes of plant hormones have received the most attention: auxins, cytokinins, ethylene, abscisic acid, gibberellins and brassinosteroids. Recently, it has become clear that additional signaling molecules are used by plants. The alkamides and *N*-acylethanolamides (NAEs) – a class of small organic compounds related to animal endocannabinoids – appear to play a role in diverse morphogenetic processes including seed germination, alteration of plant architecture and response to pathogen attack. In vertebrates, the endocannabinoid signaling pathway has been found to control cellular and morphogenetic responses including embryo development, cell proliferation, immune responses and apoptosis. The notion that plants use alkamides and NAEs to regulate physiological processes is supported by their occurrence in a wide range of plant species, their selective accumulation and rapid metabolism in response to developmental transitions and by the recent identification of the enzymatic machinery for NAE degradation. Moreover, signal transduction cascades involving glutamate and nitric oxide, partners of NAEs and alkamides in regulating animal physiology, have been found to participate in important developmental processes in plants. This information suggests that endocannabinoid-like compounds and other ancestral signaling pathways might be integral to morphogenetic and adaptive processes in plants.

**Keywords:** alkamides, *N*-acylethanolamides, endocannabinoids, plant development

**Abbreviations:** DAF2-DA, 4, 5-diaminofluorescein diacetate; FAAH, fatty acid amide hydrolase; GLR, glutamate receptor; GLU, glutamate; GPCR, G protein coupled receptor; LR, lateral root; NAE, *N*-acylethanolamide; NAPE, *N*-acylphosphatidylethanolamide; NO, nitric oxide; NPA, 1-naphthyl-phthalamic acid; PLD, phospholipase D

### CONTENTS

INTRODUCTION .....	34
ENDOCANNABINOID SIGNALING .....	35
STRUCTURE AND DISTRIBUTION OF NAES AND ALKAMIDES .....	36
BIOSYNTHESIS AND METABOLISM OF NAES AND ALKAMIDES .....	37
REGULATION OF PLANT DEVELOPMENT BY NAES AND ALKAMIDES .....	37
SIGNALING MOLECULES POTENTIALLY INVOLVED IN NAE AND ALKAMIDE REGULATION OF PLANT DEVELOPMENT .....	38
GLUTAMATE .....	39
NITRIC OXIDE .....	39
CONCLUDING REMARKS .....	40
ACKNOWLEDGEMENTS .....	40
REFERENCES .....	40

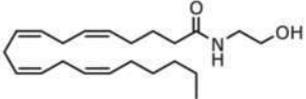
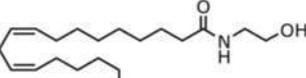
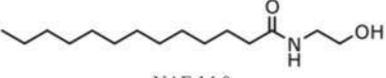
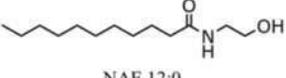
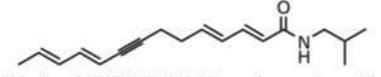
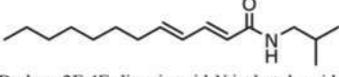
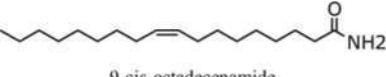
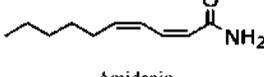
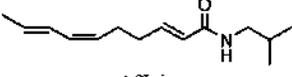
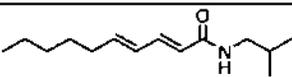
### INTRODUCTION

The development of plants is influenced both by internal physiological factors and by environmental signals, which control cell division in meristems, and growth and differentiation in roots and shoots. Plants produce compounds of different chemical identity that mediate a range of cellular functions. Auxins, cytokinins, gibberellins, abscisic acid and brassinosteroids represent different classes of organic molecules, while ethylene is a gas. These compounds are considered as plant hormones because of their widespread occurrence in plants and their diverse physiological roles (Weyers and Paterson 2001). The effects produced by each hormone have been elucidated largely from exogenous applications, by using correlations between hormone levels and growth of defined plant species, or by manipulating hormone levels in mutants and transgenic plants (Weyers

and Paterson 2001; Kakimoto 2003; Woodward and Bartel 2005). Recently, other compounds, namely polyamines, jasmonates, salicylic acid, and the peptide systemin, are being added to the list of potential plant hormones, but whether these have universal effects or act in just a few special cases has not yet been fully determined.

In the past five years, it has become evident that plants use – along with the above mentioned classical hormones – a diverse array of small molecules for extra- and intracellular signaling. Of particular interest are the plant lipids because, like their mammalian counterparts, they act not only as structural components of membranes but also as signaling molecules that regulate developmental and adaptive responses to environmental stimuli (Cruz-Ramírez *et al.* 2004; Wang 2004). *N*-acylethanolamides (NAEs) comprise a group of lipids, which are produced from the hydrolysis of *N*-acylphosphatidylethanolamide (NAPE), a minor lipid

**Table 1** Characteristics and effects of NAEs and alkamides.

Molecule (with example)	General characteristics	Biological effects
 Anandamide	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Located in all mammalian cells as a trace compound, but principally in brain where it is synthesized from a phospholipid precursor (NAPE).</li> <li>• Metabolized by a FAAH.</li> <li>• Activate CB receptors.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Modulation of neurotransmission in central nervous system.</li> <li>• Synchronization of embryo development.</li> <li>• Nociception.</li> <li>• Brain development.</li> <li>• Memory processes.</li> <li>• Cardiovascular and immune regulation.</li> <li>• Cell proliferation.</li> </ul>
 NAE 18:2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Predominant NAE in desiccated seeds.</li> <li>• Metabolized by plant lipoxygenases <i>in vitro</i>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Plays a role in regulating seed germination.</li> </ul>
 NAE 14:0	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activation of PAL gene expression.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Perception of pathogen elicitors.</li> <li>• Activation of defense responses.</li> </ul>
 NAE 12:0	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Produced from hydrolysis of NAPE by PLD.</li> <li>• Hydrolyzed by AtFAAH.</li> <li>• Rapid metabolism during seed germination.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Regulation of seed germination and normal seedling development.</li> <li>• Regulation of cell division and expansion.</li> <li>• Regulation of root architecture.</li> <li>• Control of cytoskeletal structure.</li> </ul>
 <i>N</i> -isobutyl-(E,E,E,Z)-2,4,10,tetradecaen-8-ynamide	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Present in <i>Chrysanthemum</i> plants.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Provides host-plant resistance to <i>Frankliniella occidentalis</i> (western flower thrips).</li> </ul>
 Dodeca-2E,4E-dienoic acid <i>N</i> -isobutyl amide	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Isolated from <i>Echinacea</i>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Binds to de human CB2-receptor.</li> </ul>
 9-cis-octadecenamide	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Isolated from the lichen <i>Stereocaulon alpinum</i>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibits the formation of cyclooxygenase products in sheep seminal vesicle microsomes.</li> </ul>
 Amidenin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Isolated from <i>Amycolaptosis</i> sp.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Growth-regulating activity in rice seedlings. Plant growth promotion effects at low concentrations (low <math>\mu</math>M range).</li> </ul>
 Affinin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Isolated from <i>Heliopsis longipes</i> roots.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Growth-promoting effect at low concentrations (<math>10^{-8}</math>-<math>10^{-5}</math> M).</li> <li>• Regulates root hair and lateral root formation.</li> <li>• Regulates cell division and differentiation processes.</li> <li>• Fungistatic and bacteriostatic activities.</li> </ul>
 Pellitorine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Isolated from <i>Stauranthus perforatus</i>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Allelochemical effect on <i>Amaranthus hypochondriacus</i> and <i>Echinochloa crus-galli</i> seedlings.</li> <li>• Insecticidal activity.</li> </ul>

constituent of cell membranes, by phospholipase D (PLD) (Schmid *et al.* 1996). In mammals, anandamide (NAE 20:4) acts as an endogenous ligand for cannabinoid receptors and has a number of physiological roles including the modulation of neurotransmission in the central nervous system (Wilson and Nicoll 2002), synchronization of embryo development (Paria and Dey 2000) and vasodilation (Kunos *et al.* 2000). In plants, there is information indicating that NAEs might be involved in diverse physiological processes, including seed germination, pathogenesis, regulation of root architecture and response to herbivory. Alkamides (*N*-alkyl amides) are compounds structurally related to NAEs, which have been found to alter root development and to regulate cell division and differentiation processes in *Arabidopsis thaliana*. In this review, we summarize recent research into the role of NAEs and alkamides in plant development and discuss the possibility that NAEs and alkamides could act in a common signaling pathway similar to the endocannabinoid system.

## ENDOCANNABINOID SIGNALING

Plants produce compounds of different chemical nature that modulate physiological responses in animals (Table 1). *Cannabis sativa* extracts have been in use for centuries by different civilizations for medicinal and recreational purposes (Zlas *et al.* 1993). The demonstration that many of the actions of  $\Delta$ -9-tetrahydrocannabinol (THC), the main bioactive compound of *Cannabis sativa* in mammals occur by activation of membrane cannabinoid receptors (CB1 and CB2) led to the search for endogenous cannabinoids, also termed 'endocannabinoids'. Endocannabinoids are defined as cellular compounds capable of functionally activating one or both of the established CB receptors (Di Marzo 1998). The first endocannabinoid identified was a *N*-acyl ethanolamide, anandamide (arachidonoyl-ethanolamide or NAE 20:4) (Table 1). This compound was initially isolated from pig brain and found to activate CB receptors (Devane *et al.* 1992).

**Table 2** Signaling pathways modulated by endocannabinoids, NAEs and alkamides.

Signaling molecule	Pathways involved
Animal endocannabinoids (anandamide)	Inhibition of adenylyl cyclase. Inhibition of Ca <sup>2+</sup> channels. Inhibition of gap junction-mediated and glutamate-triggered Ca <sup>2+</sup> waves. Activation of inwardly rectifying K <sup>+</sup> channels. Activation of the MAPK pathway. Activation of cytosolic phospholipase A <sub>2</sub> . Activation of NOS.
Alkamides in animals	Elevation of intracellular Ca <sup>2+</sup> . Modulation of cAMP.
NAEs/alkamides in plants	Modulation of PLD. Activation of defense responses. Activation of NOS? Interaction with glutamate signaling?

Other endocannabinoids, either ethanolamide analogs of NAE 20:4, or alternatively other arachidonic acid derivatives (i.e. 2-arachidonoylglycerol) have been isolated also from pig brain (Hanus *et al.* 1993, 2001).

Endocannabinoids exert their regulatory functions via the cannabinoid receptors CB1 and CB2 and multiple signal transduction pathways (Table 2). CB1 receptors have a widespread distribution in the brain (Herkenham *et al.* 1990). CB2 receptors are predominantly localized to cells of the immune system and to a lesser extent, in the brain (Griffin *et al.* 1999; van Sickle *et al.* 2005). Binding of endocannabinoids to CB receptors requires that the endocannabinoid should have an aliphatic chain of 20-22 carbons, with at least three non conjugated *cis* double bonds with a saturated tail of at least the last five carbons (Reggio and Traore 2000). CB1 receptors are primarily coupled to heterotrimeric G proteins, the stimulation of which leads to inhibition of adenylyl cyclase, inhibition of N- and P/Q-type calcium channels, activation of potassium channels, induction of nitric oxide synthase (NOS), activation of cytosolic phospholipase A and induction of mitogen-activated protein kinases (Table 2) (For Review see Macarrone and Finazzi 2003; Gertsch *et al.* 2006; Pertwee 2006). Recent information indicates that plants produce endocannabinoid-like compounds. For instance, *Echinacea* alkamides show strong affinity to CB2 receptors, which regulate multiple signal transduction pathways including increased cAMP, p38/MAPK signaling and ATF-2/CREB-1 activation (Gertsch *et al.* 2004; Raduner *et al.* 2006). These results highlight the role of alkamides as potent immunomodulators and ligands for CB2 receptors.

## STRUCTURE AND DISTRIBUTION OF NAEs AND ALKAMIDES

Although anandamide is perhaps the most thoroughly studied of the NAE class of compounds, other naturally occurring NAEs have been known for almost 50 years (For review see Fowler 2003). NAEs with pharmacological effects in animals include palmitoylethanolamide (PEA, C16:0), stearoylethanolamide (SEA, C18:0) and oleoylethanolamide (OEA, C18:1). Interestingly, SEA, like PEA, has no affinity towards either CB1 or CB2 receptors, whereas OEA has been found to reduce the binding of anandamide to those receptors (Jonsson *et al.* 2001). These results suggest that NAE compounds might act either as ligands or as inhibitors of CB receptors and that different signaling pathways might be involved in physiological responses to each compound.

In plants, NAEs have been found in seeds of some Angiosperms such as cotton, corn, *Arabidopsis*, soybean, peanut, okra, tomato and pea, with a total content ranging from 500 to 1600 ng/g in fresh weight, and acyl chain length ranging from 12 to 20 carbon atoms (Table 1) (Chapman 2004). Gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS) measurements have shown NAEs containing 16C and 18C

to be the most abundant NAE compounds in dry seeds. Total NAE concentrations drop drastically following imbibition in seeds of pea, cotton, peanut and *Arabidopsis* and the decline is more pronounced for NAE 18:2 (Chapman *et al.* 1999; Wang *et al.* 2006). In desiccated *Arabidopsis* seeds, total NAE content was of 2000 ng/g, and this concentration declined to 500 ng/g 96 h after sowing (Wang *et al.* 2006). Decreased NAE concentration in seeds after imbibition and during early plant growth is consistent with the notion that NAE catabolism is a prerequisite for germination and post-embryonic growth.

The vegetative tissues of plants have lower NAE contents than seeds and their NAE profile also differs from that in seeds in that NAE 12:0 and NAE 14:0 appear to predominate (Chapman 2004). There is evidence that in stem and leaves medium chain NAEs are synthesized on demand rather than stored. For instance, in tobacco leaves the concentration of NAE 14:0 is of approximately 5 ng/g in a fresh weight basis. Interestingly, a 10 min treatment with nanomolar concentrations of two protein elicitors, xylanase and cryptogein, caused a 10 and a 50-fold increase in NAE 14:0 content, respectively (Tripathy *et al.* 1999). Exogenously supplied synthetic NAE 14:0 at concentration of 1 μM induced a 4-fold increase in phenylalanine ammonia lyase (PAL) expression in a manner similar to that elicited by xylanase and cryptogein in both cell suspensions and leaves of tobacco (Tripathy *et al.* 1999). These results suggest that NAE14:0 may participate in the signal transduction events leading to plant defense responses.

Similar to NAEs, alkamides are a class of lipid molecules with different chain length and saturation grade (Table 1). These compounds are relatively common in plants, being present from lichens to Angiosperms. In angiosperms, they have been found in a variety of families, including the Asteraceae, Brassicaceae, Leguminosae, Piperaceae and Rutaceae (Gertsch *et al.* 2006; López Bucio *et al.* 2006).

Natural alkamides are often insecticidal (Tsao *et al.* 2005). The western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande) is one of the major insect pests of greenhouse floriculture. In addition to feeding on leaves and flowers, thrips can vector diseases such as tomato spotted virus, which affects a wide range of plants. Host-plant resistance to *F. occidentalis* is of potential to reduce the use of pesticides for control of this pest. Chrysanthemum cultivars show a wide variation in degree of host-plant resistance to *F. occidentalis*. Evidence for an alkamide associated with host-plant resistance to *F. occidentalis* was presented by Tsao *et al.* (2005). The authors conducted bioassay-directed fractionation of extracts of chrysanthemum leaves to isolate compounds that exhibited repellent activity against thrips. Analysis of a particular fraction that correlated with the degree of resistance of chrysanthemum to *F. occidentalis* revealed the presence of an unsaturated isobutylamide, *N*-isobutyl-(*E*, *E*, *E*, *Z*)-2,4,10,12-tetradecatetraen-8-ynamide (Table 1). This work presents compelling evidence that plant produced alkamides account for natural host-resistance to thrips and open the possibility that managing alkamide production in crops might represent a valuable target to control insect pests in agriculture.

The participation of alkamides in host-resistance to insects can be due to their role as elicitors of plant defense responses. For instance, it has been reported that linolenoyl-L-glutamine, an amide produced in oral secretions of caterpillars is able to induce the production of volatile chemicals from plants that attract predators and parasites of the caterpillar while it feeds (Lait *et al.* 2003).

Recent information suggest that alkamides can regulate microbial growth. In addition they can represent a new class of allelochemical compounds. The alkamide affinin (Table 1) from *Heliopsis longipes* and its reduced amides show fungistatic and bacteriostatic activities. Affinin was effective in inhibiting the mycelial growth of *Sclerotium cepivorum* and *Rhizoctonia solani* at concentration of 75 μg/ml and repressing growth of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* at a concentration of 150 μg/ml. The bacteriostatic

effect was more clearly observed for *N*-isobutyl-2*E*-decanamide, an alkamide derived from affinin, which inhibited bacterial growth at concentration of 5 µg/ml, a concentration 30-fold lower than that of affinin (Molina-Torres *et al.* 2004). On the other hand, Anaya and coworkers (2005) showed that pellitorin, an alkamide from *Stauranthus perforatus*, a rutaceous tree, has a strong allelochemical effect on the growth of weeds. Pellitorine in concentration of 100 µg/ml supplied to the culture medium *in vitro* caused a 45 and 80% inhibition in root growth of *Amaranthus hypochondriacus* and *Echinochloa crus-galli*, respectively. In a greenhouse experiment, the decomposition of leaves and roots of *S. perforatus* incorporated as green manures (2%) to the soil had a significant inhibitory effect in the growth of weeds. The allelopathic action of decomposition of leaves was comparable to that of DPCA (dimethyl tetrachloroterephthalate), a commercial herbicide (Anaya *et al.* 2005). Taking into account the above presented information, it is tempting to speculate that alkamide production in plants not only provides an adaptive advantage in response to pathogens and pests, but also might represent a strategy for competition.

Occasionally, alkamide accumulating plants can occur in different plant families (Molina-Torres *et al.* 1996). Certain medicinal plants such as *Echinacea angustifolia*, *Echinacea purpurea* and *Heliopsis longipes* accumulate alkamides in certain plant tissues (Bauer and Remiger 1989; Molina-Torres *et al.* 1996). In *H. longipes*, affinin accumulates especially in roots, where it is present in as high as 1% (w/w) on a fresh weight basis (Molina-Torres *et al.* 1996). Currently, no information is available about the ecological or physiological relevance of this alkamide accumulation, or about the cellular state where affinin accumulates. However, recent experiments indicate that alkamide accumulating plants such as *H. longipes* and *Acmella radicans* are resistant to the inhibitory effect of alkamides in root growth *in vitro* (López-Bucio J and Ramírez-Chávez E, unpublished information). This suggests that alkamide accumulating plants have evolved mechanisms to tolerate high concentrations of alkamides in their tissues.

In *E. purpurea*, alkamides accumulate preferentially in flower heads and in roots. Their levels are low at the beginning of vegetative growth and increase at the flowering stage (Letchamo *et al.* 1999; Qu *et al.* 2005). For total alkamides, concentrations varied from 5.0 to 27.6 mg/g in roots and from 0.22 to 5.3 mg/g in vegetative tissues (Qu *et al.* 2005). In *Piper cenocladum*, alkamide accumulation has been found to be dependent of resources such as light and the general availability of nutrients. Alkamide levels are higher in plants grown under balanced resource conditions than in poor soils, and their levels decrease with increased light intensity (Dyer *et al.* 2004). The optimal conditions for production of amides (2.8% dry weight) were fertilized soils, and the conditions associated with the lowest levels of amides (0.34% dry weight) were poor soils. To date, no information is available about the effects of individual nutrients such as nitrogen, phosphorus or potassium on alkamide accumulation. The reason why certain plants accumulate alkamides is not clear, however it could be an evolutionary advantage to cope with biotic and abiotic factors. Alternatively, alkamide accumulation might represent a mechanism to adjust their growth and development, as their importance in cellular processes is increasingly being appreciated (see below).

## BIOSYNTHESIS AND METABOLISM OF NAEs AND ALKAMIDES

NAEs are produced from the PLD-mediated hydrolysis of NAPE, a minor lipid constituent of cellular membranes (Schmid *et al.* 1996). In mammals, levels of NAPE and NAE in cultured cortical neurons are greatly increased following treatment with the Ca<sup>2+</sup> ionophore ionomycin, by K<sup>+</sup> and by activation of glutamate receptors. Interestingly, both NAPE and NAE concentrations increased by 2 to 3-fold

after 5-10 d in the presence of glutamate, indicating that neuronal activity regulates NAE production (Hansen *et al.* 1995, 1997).

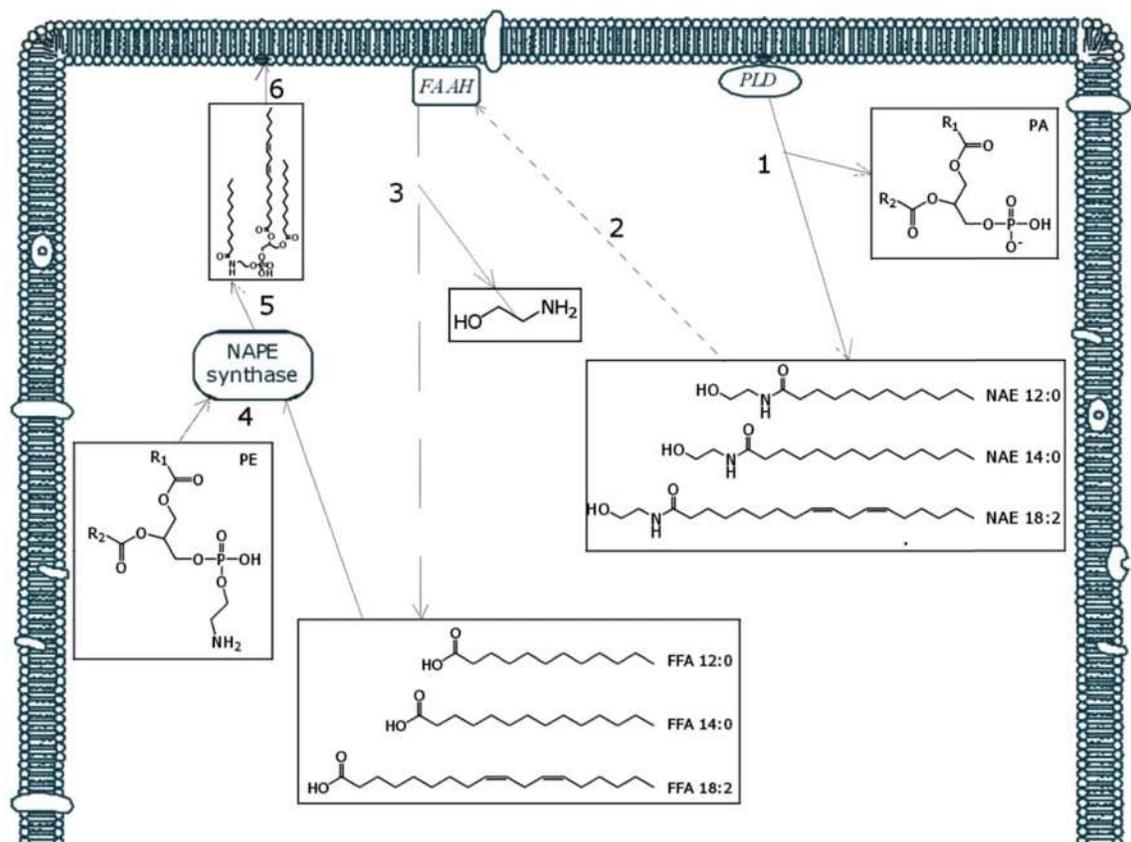
Anandamide plays an important signaling role in cellular and developmental responses acting as a ligand for cannabinoid receptors, which belong to the class A rhodopsin-like G protein coupled receptor (GPCR) family (Gertsch *et al.* 2006). The activity of anandamide is rapidly terminated through a two-step process consisting of a putative carrier-mediated transport followed by hydrolysis by a serine hydrolase, referred to as fatty acid amide hydrolase (FAAH) (Fig. 1) (Cravatt *et al.* 2004). The importance of this enzyme in animal physiology was evident after the cloning of the mice FAAH gene. For instance, the target disruption of this gene resulted in mice with hypersensitivity to exogenous anandamide and a 10-fold elevation of endogenous brain anandamide levels (Cravatt *et al.* 2001). Interestingly, there are some similarities between plants and animals in the metabolism of NAEs. For example, a functional homologue of the mammalian FAAH has been identified in plants by a combination of bioinformatics, molecular and biochemical approaches (Shresta *et al.* 2003). A full-length alignment of *Arabidopsis* FAAH amino acid sequence with rat FAAH showed that these proteins share an amidase region typical of a family of proteins that include amidase or amidohydrolase enzymes. The amidase region of these proteins consists of about 125 amino acids. There is 18.5% identity between the *Arabidopsis* FAAH and rat FAAH when compared over the entire length of the proteins, whereas there is 37% identity within the amidase region. Functional homologues of the *A. thaliana* FAAH (*AtFAAH*) were also identified in *Oryza sativa* and *Medicago truncatula*, supporting a common mechanism for the regulation of NAE hydrolysis in diverse plant species (Shresta *et al.* 2006).

Important information about the *in vivo* role of *AtFAAH* in NAE metabolism in plants came from its manipulated expression in *A. thaliana*. In this way, Wang and coworkers (2006) reported that *AtFAAH* expression and FAAH catalytic activity increased during seed germination and seedling growth, consistent with the timing of NAE depletion during seedling establishment reported previously by the same group (Chapman 2004). Moreover, the authors identified T-DNA mutants of *A. thaliana* and generated transgenic plants overexpressing *AtFAAH*. They found that seeds of *AtFAAH* mutants had elevated levels of endogenous NAEs, and seedling growth was hypersensitive to exogenously applied NAE 12:0. In contrast, seeds and seedlings of *AtFAAH* overexpressing plants had lower endogenous NAE content, and seedlings were less sensitive to exogenous NAE (Wang *et al.* 2006). These results suggest that *AtFAAH* is a modulator of endogenous NAE levels in plants, and that NAE depletion might be a prerequisite for certain plant developmental transitions.

Alkamides and NAEs are structurally related to sphingolipids. The possibility that a breakdown product of ceramide or other sphingolipids may result in metabolites with the observed function of alkamides has been recently considered (Ramírez-Chávez *et al.* 2004). Whether alkamides and sphingolipids have similar biological activities or act through common signaling pathways remains to be determined.

## REGULATION OF PLANT DEVELOPMENT BY NAEs AND ALKAMIDES

Several key observations suggest that NAEs and alkamides function as regulators of processes associated with cell division, expansion and seedling growth. First, seed germination and seedling growth depend upon synchronized cell division in the meristems and cell expansion. In *A. thaliana*, the increase in *AtFAAH* expression and NAE hydrolase activity during seed germination and early plant growth correlates with the depletion of endogenous NAEs (Wang *et al.* 2006). Second, micromolar concentrations of NAE 12:0 and NAE 18:2 supplied to *A. thaliana* seedlings grown in agar



**Fig. 1** NAE metabolism in plant tissues. NAEs and alkamides are probably derived from a minor membrane lipid constituent, the *N*-acylated-phosphatidylethanolamine (NAPE) (on gray in scheme), hydrolyzed by a phospholipase D (PLD) (1). This reaction produces a corresponding NAE and a molecule of phosphatidic acid (PA) (2). NAEs are hydrolyzed by a fatty acid amide hydrolase (FAAH) (3) producing a free fatty acid (FFA) and ethanolamine (4). FFA can be utilized to acylate the amino head group of phosphatidylethanolamine (PE) through an enzyme designated NAPE synthase (5) producing NAPE (6), which is integrated into the cell membrane.

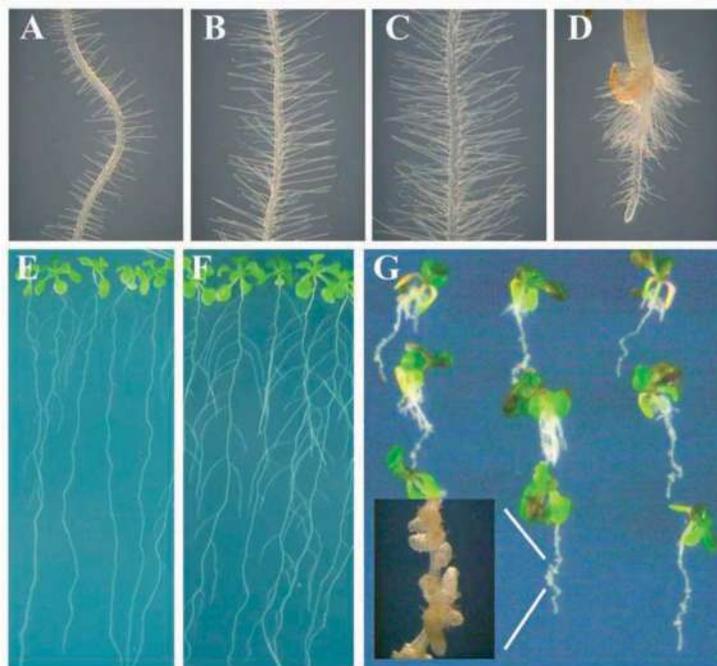
plates inhibited root development and disrupted normal cell growth in a dose-dependent and selective manner (Blancaflor *et al.* 2003; Motes *et al.* 2005; Wang *et al.* 2006). Third, constitutive overexpression of *AtFAAH1* led to plants with reduced NAE content in their seeds and seedlings. This reduction correlated with accelerated seedling growth and the formation of organs that were significantly larger in size (Wang *et al.* 2006). These results suggest that NAEs might be acting as repressors of morphogenetic processes and that their degradation is a prerequisite to normal plant development. However, the precise mechanism underlying NAE metabolism and plant growth may involve a more complex signaling network, because there are multiple types of NAEs in plants and because their structurally related alkamides have found to promote growth and regulate plant architecture.

Two reports indicate that alkamides may act as plant growth regulating substances. Kanbe and coworkers (1993) showed that amidinenin (Table 1), a non-substituted alkamide isolated from the actinomycete *Amiclotopsis* sp., promoted the growth of rice (*Oryza sativa*) plants at concentrations of 0.6 and  $1.8 \times 10^{-5}$  M and inhibited growth at concentration of  $6 \times 10^{-5}$  M. More recently, our group evaluated the effects of affinin and reduced amides in the growth and development of *A. thaliana* seedlings (Ramírez-Chávez *et al.* 2004). Together with a general plant growth promoting effect, affinin showed a dose-dependent effect in root system architecture that included increased growth of root hairs (Fig. 2A-D), and lateral roots at concentration of  $2.8 \times 10^{-5}$  M (Fig. 2E-G), and decreased primary root growth at higher concentrations (Fig. 2G). Similar to NAEs,

the repressing effect of affinin on primary root growth correlated with an inhibition in proliferative activity in the primary root meristem and reduced lateral root elongation (Fig. 2G-inset), suggesting that NAEs and alkamides may share common signaling mechanisms in the regulation of cellular processes.

#### SIGNALING MOLECULES POTENTIALLY INVOLVED IN NAE AND ALKAMIDE REGULATION OF PLANT DEVELOPMENT

The effects of NAE 12:0 and affinin in root development suggest that phytohormones could be involved in the response of plants to alkamides. Auxin is involved in altering primary root growth and in promoting root hair and lateral root formation. It has been shown that application of natural and synthetic auxins increases lateral root formation, whereas auxin transport inhibitors reduce lateral root numbers (Casimiro *et al.* 2001; Himanen *et al.* 2002; López-Bucio *et al.* 2005; Woodward and Bartel 2005). Two lines of evidence indicate that the effects of affinin on the *Arabidopsis* root system architecture are likely independent of auxin signaling. First, the examination of primary root growth of auxin-resistant mutants *aux1-7*, *eir1*, and *axr4-2* in response to a high affinin concentration revealed a primary root growth inhibition similar to WT plants. Second, alkamides failed to activate the expression of the auxin-inducible gene markers DR5:*uidA* and BA3:*uidA* in primary roots (Ramírez-Chávez *et al.* 2004). This information suggests that alkamides regulate root development by an auxin independent signaling mechanism. The potential of emer-



**Fig. 2 Regulation of plant growth by affinin.** Wildtype *A. thaliana* (Col-0) seedlings were grown for (A-D) 6 or (E-G) 10 d under 0 (A, E), 3.2 (B, F), 12.5 (C) or 25 (D, G) mg/l affinin concentrations on vertically oriented agar plates. At d 6, light microscope images of control (A) and affinin induced-root hairs (B-D) were taken. The promoting effects of affinin in lateral root development are appreciated at d 10 (E-G). Primary root growth inhibition by high concentrations of affinin correlates with the transformation of lateral roots into nodule-like structures (G-inset).

ging signaling molecules in plants such as GLU and NO as alkamide interacting partners in plant growth regulation is further considered, since in animals GLU activates the biosynthesis of NAEs during neuronal activity (Hansen *et al.* 1995, 1997), and because NAEs have been found to activate NO biosynthesis through regulation of NO synthase (Maccarrone and Finazzi-Agró 2003).

#### GLUTAMATE

Mineral nutrients such as N, P and Fe are critical factors for plant growth and development that act as signals to modify physiological responses (López-Bucio *et al.* 2003). Plants can obtain N from nitrate, the major form of N in soil, or from aminoacid pools present in the soil as organic matter is decomposed by microorganisms. Given the importance of aminoacids for plant N nutrition, until recently, very little work had been done to evaluate potential regulatory interactions between aminoacids and plant development. Glutamate is an aminoacid critical for N metabolism, being the product of the GOGAT cycle and an amino-N donor for synthesis of other aminoacids. Recent information indicates that GLU can act as a signal to regulate cellular and morphogenetic processes in plants (Sivaguru 2003; Walch-Liu *et al.* 2006). Treatments with millimolar concentrations of 1-GLU inhibited mitotic activity in the root apical meristem and increased radial expansion of root cells, giving rise to the formation of short primary roots. Interestingly, GLU did not interfere with lateral root initiation or outgrowth. Only some time after emergence, lateral roots acquired GLU sensitivity, indicating that their ability to respond to GLU is developmentally regulated (Walch-Liu *et al.* 2006). GLU is thought to act by its recognition by a family of ionotropic GLU receptors (GLRs). GLRs are involved in excitatory neurotransmission in mammalian synapses and have been found to be phylogenetically conserved in bacteria, plants and animals (Chiu *et al.* 2002). In *A. thaliana*, there is a family of 20 genes that encode homologs to animal GLU receptors (Lam *et al.* 1998; Lacombe *et al.* 2001). Members of this family have been proposed to be the best candidates for the role of GLU sensors in root tips (Walch-Liu *et al.* 2006).

The observation that both NAEs and GLU inhibit primary root growth and stimulate radial expansion, effects

related to microtubule depolymerization (Blancaflor *et al.* 2003; Sivaguru *et al.* 2003; Walch-Liu *et al.* 2006), suggests that these compounds may interact in the signaling cascades that modify root development. It has been recently reported that the short root phenotype of a rice mutant defective in the expression of the *OsGLR3.1* gene is due to disruption of proliferative activity in the root apex (Li *et al.* 2006), suggesting that this *GLR* gene has an essential role in cell division. Further insight into potential interactions between NAEs and GLU in plant development may come from the analysis of other members of the *GLR* family from *A. thaliana* and *O. sativa* and from NAE determinations following GLU treatment.

#### NITRIC OXIDE

Nitric oxide (NO) is a diffusible molecule involved in diverse physiological processes in phylogenetically distant species (Gow and Ischiropoulos 2001). It was first described in mammals, where it plays variable functions ranging from vasodilation to neurotransmission and immune responses (Gow and Ischiropoulos 2001). NO has been quantified in plants and novel and important roles are being attributed to this molecule, from pathogen defense to growth and development (Lamattina *et al.* 2003; Neill *et al.* 2003). With regard to plant architecture, increasing information has been accumulating pointing out to a critical role for NO in adventitious and lateral root formation. Lateral roots (LRs) and adventitious roots (ARs) are important in determining the success of plants by allowing the construction of branched root systems, which are more efficiently in exploring the soil layers to extract water and mineral nutrients. LRs originate from the root pericycle, in which individual quiescent cells are stimulated to dedifferentiate and proliferate to form a LR primordium. Cells in the LR primordium differentiate and grow, causing the LR to emerge through the primary root (Laskowsky *et al.* 1995; Dubrovsky *et al.* 2001). Pagnussat and associates were the first to demonstrate that NO participates in the auxin-regulated process of adventitious root formation in plants (Pagnussat *et al.* 2002, 2003). They showed that in cucumber (*Cucumis sativus*) plants, the NO-donor sodium nitroprusside promotes adventitious rooting in auxin-depleted plants treated with 1-naphthyl-phtalamic acid (NPA), an auxin transport inhibitor.

On the contrary, the specific NO scavenger cPTIO prevented the effect of sodium nitroprusside (Pagnussat *et al.* 2003). Later, it was confirmed that NO also plays a central role in lateral root formation in tomato (Correa-Aragunde *et al.* 2004). Interestingly, detection of endogenous NO by the specific probe 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2 DA) revealed that the NO signal was specifically located in LR and AR primordia (Correa-Aragunde *et al.* 2004; Xiao-Ping and Ai-Xia 2004), suggesting a role for NO both for LR initiation and outgrow. These results are similar to those reported by Ramírez-Chávez *et al.* (2004), which showed a stimulatory effect of affinin in several stages of LR development, although this effect was found to be independent of auxin. Recent findings showing that alkalimides promote adventitious root formation in a dose dependent way (M. Millán-Godínez, A. Méndez-Bravo, J. López-Bucio, unpublished results), allow us to speculate that NO could play a role in the alkalimide-induced lateral root formation. A common role of NO as a second messenger in mediating the pericycle responses to auxin and alkalimides may explain why the two regulators exert an independent but similar stimulatory effect in lateral root formation.

### CONCLUDING REMARKS

In the last five years, tremendous strides have been made in our understanding of plant signaling and gene regulation. A novel group of plant signaling molecules, NAEs and the related alkalimides, which are probably derived from membrane lipids by the action of PLDs, have been found to regulate many aspects of plant growth and development. NAEs share structural similarity with anandamide, an endocannabinoid from mammals. This observation, together with the finding that certain alkalimides isolated from *Echinacea angustifolia*, are able to interact with mammalian cannabinoid receptors (Woelkart *et al.* 2005; Raduner *et al.* 2006), led to the suggestion that components of an endocannabinoid signaling system may be conserved in animals and plants (López-Bucio *et al.* 2006). Although anandamide itself has never been isolated from plant sources, it has been suggested that plant alkalimides may be regulating cellular responses through novel signaling mechanisms that probably involve endogenous lipid signals (Ramírez-Chávez *et al.* 2004). Although the effects of alkalimides on root hair and primary root growth are somewhat independent from the canonical auxin pathway, the possible cross-talk between these regulators is just emerging since alkalimides have been found to elicit lateral and adventitious root initiation and growth. There may even be some link with the gibberellic acid and abscisic acid pathways as suggested by the activation of FAAH during germination (Wang *et al.* 2006). In this regard, our group has achieved an important goal in isolating alkalimide oversensitive and resistant *Arabidopsis* mutants that show altered germination and post-embryonic growth, highlighting the importance of this pathway in plant development (Pelagio-Flores R and López-Bucio J, unpublished information).

GLU and NO, two signaling molecules with novel signaling roles in plants, have been found to modify root system architecture in a similar way to NAEs and alkalimides. Elucidating how alkalimides interact with GLU and NO to regulate root system architecture and other aspects of plant development remains a major challenge. The adoption of an integrated experimental approach that combines molecular genetics, cell biology and analytical chemistry could be an effective strategy to increase our understanding on the biological roles of NAEs and alkalimides in plants and their signaling mechanisms.

### ACKNOWLEDGEMENTS

The writing of this review was supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México, grant no. 43978) and the Consejo de la Investigación Científica (UMSNH, México, grant no. C1C 2.26). We thank Enrique Rami-

rez-Chávez for important technical assistance and Luis Herrera-Estrella and Jorge Molina-Torres for their initial support and continuous discussion to our work on cannabinoid signaling. We gratefully acknowledge Carlos Sosa Aguirre for critical reading of this manuscript.

### REFERENCES

- Anaya AL, Macías-Rubalcava M, Cruz-Ortega R, García-Santana C, Sánchez-Monterrubio FN, Hernández-Bautista BE, Mata R (2005) Allelochemicals from *Stauranthus perforatus*, a Rutaceous tree of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Phytochemistry* 66, 487-494
- Bauer R, Remiger P (1989) TLC and HPLC analysis of alkalimides in *Echinacea* drugs. *Planta Medica* 55, 367-371
- Blancaflor EB, Hou G, Chapman KD (2003) Elevated levels of *N*-lauroylethanolamide, and endogenous constituent of desiccated seeds, disrupt normal root development in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Planta* 217, 206-217
- Casimiro I, Marchant A, Bhalerao RP, Beckman Y, Dhange S, Swarup R, Graham N, Inze D, Sandberg G, Casero PJ (2001) Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* 13, 843-852
- Chapman KD, Venables V, Markovic RM, Blair R, Bettinger C (1999) *N*-acyl ethanolamines in seeds, quantification of molecular species and their degradation upon imbibition. *Plant Physiology* 120, 1157-1164
- Chapman KD (2004) Occurrence, metabolism, and prospective functions of *N*-acyl ethanolamines in plants. *Progress Lipid Research* 43, 309-327
- Chiu JC, Brenner ED, De Salle R, Nitahach MN, Holmes TC, Coruzzi GM (2002) Phylogenetic and expression analysis of the glutamate receptor-like gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Biology of Evolution* 19, 1066-1082
- Correa-Aragunde N, Graziano M, Lamattina L (2004) Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta* 218, 900-905
- Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MF, Bracey MH, Giang DK, Martin BR, Litchman AH (2001) Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98, 9371-9376
- Cravatt BF, Saghatelian A, Hawkins EG, Clement AB, Bracey MH, Litchman AH (2004) Functional dissociation of the central and peripheral fatty acid amide signaling systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101, 10821-10826
- Cruz-Ramírez A, López-Bucio J, Ramírez-Pimentel JG, Zurita-Silva A, Sánchez-Calderón L, Ramírez-Chávez E, González-Ortega E, Herrera-Estrella L (2004) The xip1 mutant of *Arabidopsis* reveals a critical role for phospholipid metabolism in root system development and epidermal cell integrity. *Plant Cell* 16, 2020-2034
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson IA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258, 1946-1949
- Di Marzo V (1998) Endocannabinoids and other fatty acid derivatives with cannabinoid properties: biochemistry and possible pathophysiological relevance. *Biochimica et Biophysica Acta* 1392, 153-175
- Duhrovsky JG, Rost TL, Colón-Carmona A, Doerner P (2001) Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 214, 30-36
- Dyer LA, Dodson CD, Richards X (2004) Isolation, synthesis and evolutionary ecology of Piper amides. In: Dyer LA, Palmer AN (Eds) *Piper: A Model Genus for Studies of Evolution, Chemical Ecology and Trophic Interactions*, Kluwer Academic Publishers, Boston, USA, pp 117-139
- Fowler CJ (2003) Plant-derived, synthetic and endogenous cannabinoids as neuroprotective agents. Non-psychoactive cannabinoids, entourage compounds and inhibitors of *N*-acyl ethanolamine breakdown as therapeutic strategies to avoid psychotropic effects. *Brain Research Reviews* 41, 26-43
- Gertsch J, Schoop R, Kuenzle U, Suter A (2004) Echinacea alkylamides modulate TNF- $\alpha$  gene expression via cannabinoid receptor CB2 and multiple signal transduction pathways. *FEBS Letters* 577, 563-569
- Gertsch J, Raduner S, Altman KH (2006) New natural noncannabinoid ligands for cannabinoid type-2 (CB2) receptors. *Journal of Receptors and Signal Transduction* 26, 709-730
- Gow AJ, Ischiropoulos HJ (2001) Nitric oxide chemistry and cellular signaling. *Journal of Cell Physiology* 187, 277-282
- Griffin G, Wray EJ, Tao Q, McAllister SD, Rorrer WK, Aung MM, Martin BR, Aboud ME (1999) Evaluation of the cannabinoid CB2 receptor-selective antagonist SR144528: further evidence for cannabinoid CB2 receptor absence in the rat nervous system. *European Journal of Pharmacology* 377, 117-125
- Hanus L, Gopher A, Almqvist S, Mechoulam R (1993) Two new unsaturated fatty acid ethanolamides in brain that bind to the cannabinoid receptor. *Journal of Medical Chemistry* 36, 3032-3034
- Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R (2001) 2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences USA* 98, 3662-3665
- Hansen HS, Lauritzen L, Strand AM, Moesgaard B, Frandsen A (1995) Glutamate stimulates the formation of *N*-acylphosphatidylethanolamide and *N*-acylethanolamide in cortical neurons in culture. *Biochimica et Biophysica Acta* 1258, 303-308
- Hansen HS, Lauritzen L, Strand AM, Vinggaard AM, Frandsen A, Sebushoe A (1997) Characterization of glutamate-induced formation of *N*-acylphosphatidylethanolamine and *N*-acylethanolamine in cultured neocortical neurons. *Journal of Neurochemistry* 69, 753-761
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson RM, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1990) Cannabinoid receptor localization in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87, 1932-1936
- Himanen K, Boucheron E, Vaneste S, Almeida-Engler J, Inzé D, Beeckman T (2002) Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell* 14, 2339-2351
- Jonsson KE, Vandevoorde S, Lambert DM, Tiger G, Fowler CJ (2001) Effects of homologues and analogues of palmitoylethanolamide upon the inactivation of the endocannabinoid anandamide. *British Journal of Pharmacology* 133, 1263-1275
- Kaldamoto T (2003) Perception and signal transduction of cytokinins. *Annual Review of Plant Biology* 54, 605-627
- Kambe K, Naganawa H, Okamura M, Sasaki T, Humada M, Okami Y, Takeuchi T (1993) Arnidenin, a new plant growth regulating substance isolated from *Amycolatopsis* sp. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 57, 1261-1263
- Kunze G, Jarai Z, Batkai S, Ishak EJ, Liu J, Wang L, Wagner JA (2000) Endocannabinoids as vascular modulators. *Chemistry and Physics of Lipids* 108, 159-168
- Lacombe B, Becker D, Heldrich R, De Salle R, Hollman M, Kwak JM, Schroeder JI, Le Novère N, Nam HG, Spalding EP (2001) The identity of plant glutamate receptors. *Science* 292, 1486-1487
- Lait CG, Alborn HT, Teal PE, Tumlinson JH (2003) Rapid biosynthesis of *N*-linolenoyl-L-glutamine, an elicitor of plant volatiles, by membrane associated enzymes in *Manduca sexta*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100, 7027-7032
- Lam HM, Chiu J, Hsieh M, Meisel L, Oliveira IC, Shin M, Coruzzi GM (1998) Glutamate receptor genes in plants. *Nature* 396, 125-126
- Lamattina L, Garcia-Mata C, Graciano M, Pagnussat G (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annual Review of Plant Biology* 54, 109-136
- Laskowsky MJ, Williams ME, Nusbaum HC, Sussex IM (1995) Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development* 121, 3303-3310
- Letehmo W, Livesey J, Arnason TJ, Bergeron C, Krutillina VS (1999) Cichoric acid and isobutylamide content in *Echinacea purpurea* as influenced by flower developmental stages. In: Janick J (Ed) *Perspectives on New Crops and New Uses*. ASHS Press, Alexandria, VA, pp 494-498
- Li J, Zhu S, Song X, Shen Y, Yu J, Yi K, Liu Y, Karplus VJ, Wu P, Deng XW (2006) A rice glutamate receptor-like gene is critical for the division and survival of individual cells in the root apical meristem. *Plant Cell* 18, 340-349
- López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 280-287
- López-Bucio J, Hernández-Abreu E, Sánchez-Claderón L, Pérez-Torres A, Rampey RA, Bartel B, Herrera-Estrella L (2005) An auxin transport independent pathway is involved in phosphate stress-induced root architectural alterations in *Arabidopsis*: Identification of BIG as a mediator of auxin in pericycle cell activation. *Plant Physiology* 137, 681-691
- López-Bucio J, Acevedo-Hernández G, Ramírez-Chávez E, Molina-Torres J, Herrera-Estrella L (2006) Novel signals for plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 9, 523-529
- Macarrone M, Finazzi-Agró A (2003) The endocannabinoid system, anandamide and the regulation of mammalian cell apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 10, 946-955
- Molina-Torres J, Salgado-Garcigla R, Ramirez-Chavez E, del Rio R (1996) Purely olefinic alkaloids in *Heliopsis longipes* and *Acmeia (Spilanthes) oppositifolia*. *Biochemistry and Systematic Ecology* 24, 43-47
- Molina Torres J, Sañazar-Cabrera CJ, Armenta-Salinas C, Ramirez-Chavez E (2004) Fungistatic and bacteriostatic activities of alkaloids from *Heliopsis longipes* roots: affinin and reduced amides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 4700-4704
- Motes CM, Pechter P, Min-Yoo C, Yub-Shu W, Chapman KD, Blancaflor E (2005) Differential effects of two phospholipase D inhibitors, 1-butanol and *N*-acylethanolamine, on *in vivo* cytoskeletal organization and *Arabidopsis* seedling growth. *Protoplasma* 226, 109-123
- Neill SJ, Desikan R, Hancock JT (2003) Nitric oxide signaling in plants. *New Phytologist* 159, 11-35
- Pagnussat GC, Simontacchi M, Puntarulo S, Lamattina L (2002) Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiology* 129, 954-956
- Pagnussat GC, Lanteri ML, Lamattina L (2003) Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiology* 132, 1241-1248
- Paria BC, Dey SK (2000) Ligand-receptor signaling with endocannabinoids in preimplantation embryo development and implantation. *Chemistry and Physics of Lipids* 108, 211-220
- Pertwee RG (2006) Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *British Journal of Pharmacology* 147, S163-S171
- Qu L, Chen Y, Wang X, Scalzo R, Davis JM (2005) Patterns of variation in alkaloids and cichoric acid in roots and aboveground parts of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *HortScience* 40, 1239-1242
- Ramírez-Chávez E, López-Bucio J, Herrera-Estrella L, Molina-Torres J (2004) Alkaloids isolated from plants promote growth and alter root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 134, 1058-1068
- Raduner S, Majewska A, Chen JZ, Xie XQ, Hamon J, Faller B, Altman KH, Gertsch J (2006) Alkylamides from *Equinaceae* are a new class of cannabinoid-mimetics. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 14192-14206
- Reggio PH, Trzorek H (2000) Conformational requirements for endocannabinoid interaction with the cannabinoid receptors, the anandamide transporter and fatty acid amidohydrolase. *Chemistry and Physics of Lipids* 108, 15-35
- Schmid HH, Schmid PC, Natarajan V (1996) The *N*-acylation-phosphodiesterase pathway and cell signaling. *Chemistry and Physics of Lipids* 80, 133-142
- Shrestha R, Dixon RA, Chapman KD (2003) Molecular identification of a functional homologue of the mammalian fatty acid amide hydrolase in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 34990-34997
- Shrestha R, Kim SC, Dyer JM, Dixon RA, Chapman KD (2006) Plant fatty acid (ethanol) amide hydrolases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1761, 324-334
- Sivaguru M, Pike S, Gaussman W, Baskin TI (2003) Aluminum rapidly depolymerizes cortical microtubules and depolarizes the plasma membrane: evidence that these responses are mediated by a glutamate receptor. *Plant Cell Physiology* 44, 667-675
- Tripathy S, Venables B, Chapman K (1999) *N*-acylethanolamines in elicitor signal transduction and activation of defense gene expression. *Plant Physiology* 121, 1299-1308
- Tsao R, Marvin CH, Broadbent AB, Friesen M, Allen WR, McGarvey BD (2005) Evidence for an isobutylamide associated with host-plant resistance to western flower thrips, *Franklinella occidentalis*, in chrysanthemum. *Journal of Chemical Ecology* 31, 103-110
- van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Moughate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makryannis A, Plomeli D, Davison JS (2005) Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 310, 329-332
- Venables BJ, Waggoner CA, Chapman KD (2005) *N*-acylethanolamines in selected legumes. *Phytochemistry* 66, 1913-1918
- Walch-Lim P, Lai-Hua L, Remus T, Tester M, Forte BG (2006) Evidence that L-glutamate can act as an exogenous signal to modulate root growth and branching in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* 47, 1045-1057
- Wang X (2004) Lipid signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 329-336
- Wang YS, Shrestha R, Kilaru A, Wiant W, Venables BJ, Chapman KD, Blancaflor E (2006) Manipulation of *Arabidopsis* fatty acid amide hydrolase expression modifies plant growth and sensitivity to *N*-acylethanolamines. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103, 12197-12202
- Weyers JDB, Paterson NW (2001) Plant hormones and the control of physiological processes. *New Phytologist* 152, 375-407
- Wilson RI, Nicoll RA (2002) Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 296, 678-682
- Woelkart K, Xu W, Pei Y, Makryannis A, Picone RP, Bauer R (2005) The endocannabinoid system as a target for alkaloids from *Echinacea angustifolia* roots. *Planta Medica* 71, 701-705
- Woodward AW, Bartel B (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* 95, 707-735
- Xiao-Ping S, Ai-Xin H (2004) Change of nitric oxide and NADPH-diaphorase during the generation and the development of adventitious roots in mung bean hypocotyl cuttings. *Acta Botanica Sinica* 46, 1049-1055
- Zlas J, Stark H, Seligman J, Levy R, Werker E, Breuer A, Mechoulam R (1993) Early medical use of cannabis. *Nature* 362, 215-216

### 6.3 CAPITULO III.

## CARACTERIZACIÓN DE LA MUTANTE HIPERSENSIBLE A LA *N*-ISOBUTIL DECANAMIDA (*DECANAMIDE HYPERSENSITIVE MUTANT 1*) (*dhm1*).

### 6.3.1. RESUMEN

El desarrollo vegetal es un proceso altamente controlado que involucra diversos factores como la luz, la temperatura, la humedad etc. Estas señales ambientales pueden afectar la producción de reguladores del crecimiento vegetal y modular la expresión genética. Entre estos reguladores del crecimiento, se encuentran moléculas lipídicas pequeñas que participan en la morfogénesis vegetal, tal es el caso de las *N*-acil-etanolamidas (NAEs) y las alcanidas. El compuesto más activo entre estas moléculas descrito hasta la fecha es la alcanida *N*-isobutil decanamida. Este compuesto inhibe el crecimiento de la raíz primaria, induce la formación de raíces laterales y adventicias, así como de estructuras neoplásicas sobre las hojas, poniendo de manifiesto que las alcanidas pueden estar involucradas en el control del crecimiento y desarrollo de las plantas. En un escrutinio de aproximadamente 25,000 líneas de semillas mutagenizadas con EMS, sembradas en medio suplementado con *N*-isobutil decanamida, se aisló una mutante hipersensible, identificada por la presencia generalizada de neoplasias en las hojas y tallos, esta se denominó *dhm1* (*decanamide hypersensitive mutant 1*). En este trabajo se realizó la caracterización genética de *dhm1*, afectada un gen recesivo. Cuando se crece en medio MS, la mutante germina en un tiempo menor, tiene una raíz más ramificada y produce más biomasa tanto en la raíz como en el follaje, todo esto en comparación con su parental silvestre (Col-0). Sin embargo en suelo, las plantas son más pequeñas que las silvestres con un ciclo de vida similar. Al adicionar *N*-isobutil decanamida, la *dhm1* responde con la inducción de raíces laterales y de neoplasias sobre las hojas. En *dhm1* la respuesta a AIA, cinetina y ABA sobre el crecimiento de la raíz es similar al control; mientras la respuesta a GA3 es de hipersensibilidad, lo que sugiere una interrelación entre la ruta de giberelinas y alcanidas. La transferencia del marcador

*DR5:uidA* no muestra diferencias en su expresión en *dhm1*, mientras *ARR5:uidA* tiene una expresión disminuida, lo que sugiere que no hay una interacción directa con auxinas, pero sí con citocininas. En el caso de *CLV3:uidA*, un marcador de meristemas, existe una expresión ectópica de este regulador en *dhm1* en los primeros estadios del desarrollo, lo que sugiere que la alcamida está involucrada en el desarrollo del meristemo apical. Por otra parte, el meristemo de la raíz primaria de *dhm1* es más largo y ancho que el de plantas silvestres; sin embargo, las células de la raíz, las hojas y los peciolo son más pequeñas en *dhm1*, sugiriendo una mayor proliferación celular en *dhm1*. Todos estos datos apuntan a que el gen afectado en *dhm1* estaría involucrado en distintos programas del desarrollo temprano de la planta, como la germinación, la arquitectura del sistema radicular y la homeostasis en el meristemo apical.

### 6.3.2. ABSTRACT

Plant development is a highly controlled process modified by external factors such as light, temperature and humidity. These factors may affect the levels of plant growth regulating substances, which in turn affect gene expression. There are small lipids capable of generating significant changes in plants, the NAES and alkamides. The most active compound among these, *N*-isobutyl decanamide inhibits primary root growth, induces formation of lateral and adventitious roots, and neoplastic structures on leaves, suggesting that alkamides are involved in plant development. In a screening of about 25,000 EMS mutagenized seedlings grown in medium with *N*-isobutyl decanamide, one hypersensitive mutant was identified by the widespread presence of neoplastic structures on leaves, *dhm1* (*decanamide hypersensitive mutant 1*). This work presents the genetic characterization of the *dhm1* mutant, which is affected in a recessive trait. Mutant seedlings have a more branched root system, and produce higher root and shoot biomass than WT (Col-0) seedlings. When grown in soil, *dhm1* mutants are smaller than WT seedlings and show a similar life cycle. *dhm1* shows increased formation of lateral roots and greater induction of tumors on leaves in response to *N*-isobutyl decanamide. Moreover, *drr1* root growth is similar to

the control in response to IAA, kinetin and ABA, but hypersensitive to GA3, suggesting a crosstalk between gibberellin and alkamide pathways. *DR5:uidA* expression do not change in *dhm1* seedlings when compared to WT plants, while *ARR5:uidA* expression decreases in the mutants. *CLV3:uidA*, show ectopic expression in the mutant at early stages of development, suggesting the alkamides are involved in apical meristem development. The primary root meristem of *dhm1* is longer and wider than Col-0, but the cells in the elongation zone are smaller in *dhm1*, similarly, the leaf and petiole cells are smaller in the mutant, suggesting an increase in cell proliferation in *dhm1*. All these data suggest that the gene affected in *dhm1* is involved in early plant development in processes such as root system architecture, leaf development and homeostasis in the apical meristem.

### 6.3.3 INTRODUCCION

Las plantas son organismos sesiles multicelulares, que poseen al menos tres partes bien definidas: a) la raíz, estructura subterránea de la planta que participa en el anclaje al suelo, así como en la toma de agua y nutrientes, b) el tallo, que tiene como funciones dar soporte estructural a las hojas, transportar agua y nutrientes de un lugar de la planta a otro, y c) el follaje, que incluye hojas, flores y frutos que son capaces de fotosintetizar, además tiene la importante función reproductiva y de dispersión de semillas. La configuración anatómica de la raíz, el tallo y el follaje para conformar a la planta es conocida como arquitectura de la planta. En plantas superiores, existe una gran variedad de formas arquitectónicas que están definidas por el grado de ramificaciones, la elongación internodal en el tallo y el follaje, así como el crecimiento de la raíz primaria y la formación de raíces laterales y adventicias en el sistema radicular (López-Bucio *et al.* 2005, Wang y Li 2008, Ortiz-Castro *et al.* 2009). El estudio de plantas modelo, como *A. thaliana* permite entender la base genética y molecular de la arquitectura de las plantas. Uno de los métodos empleados para ello es la identificación de plantas mutantes con defectos en su arquitectura y su posterior caracterización (Wang y Li 2008).

Durante la embriogénesis se establece el plan de organización de la planta, que incluye el meristemo apical del tallo (SAM) y el meristemo apical de la raíz (RAM), los cuales determinan la arquitectura de la parte aérea y subterránea, respectivamente (Newman *et al.* 2002, Wang y Li 2008, Leasure *et al.* 2009). Los meristemos son los sitios en donde se encuentra un grupo de células madre indiferenciadas y pluripotentes cuyo número permanece constante, su homeostasis se mantiene gracias al balance entre la proliferación y la diferenciación celular, cuando las células se desplazan desde el centro del meristemo, empiezan a diferenciarse para dar lugar a la estructura de la planta. Los meristemos están organizados de diferente manera (Gegas y Donnan 2006, Sarkar *et al.* 2007). En el meristemo radicular, un pequeño grupo de células mitóticamente inactivas denominado centro quiescente (QC), organiza a las células madre adyacentes, que producen filas de células para formar las capas de tejidos a través de reiteradas divisiones. Las células hijas se dividen varias veces en la zona meristemática para posteriormente elongarse y diferenciarse, formando la raíz. El QC organiza las células que dan origen a la columela y a la cofia (Hardtke 2006, Sarkar *et al.* 2007). Las células del QC expresan un factor transcripcional denominado *WUS-RELATED HOMEODOMAIN 5 (WOX5)*, que mantiene la población distal de células madre (Sarkar *et al.* 2007). *WOX5* es reprimido por un miembro de la familia *CLV3/ENDOSPERM SURROUNDING REGION (CLE)*, el *CLE40*, que es producido en las células de la columela (Stahl y Simons 2010).

En contraste, el meristemo del follaje está organizado en capas celulares (L1-L3) y en zonas (central, periférica y “rib”), controladas por un centro organizador (OC) que regula a todas las células madre (Gegas y Donnan 2006, Shani *et al.* 2006). Los genes que regulan la organización del grupo de células madre son diferentes en el meristemo apical que en el radicular (Sarkar *et al.* 2007). En el SAM, un mecanismo de retroalimentación entre el OC y las células madre regula dinámicamente la población de estas últimas: la actividad de *WUSCHEL (WUS)* en OC mantiene a las células madre indiferenciadas e induce la expresión del péptido señal *CLAVATA3 (CLV3)*, que a su vez restringe el dominio de expresión de *WUS* (Shani *et al.* 2006, Beveridge *et al.* 2007, Jun *et al.* 2007, Sarkar *et al.* 2007).

El desarrollo vegetal está controlado por moléculas orgánicas denominadas fitohormonas o reguladores del crecimiento, que regulan diferentes procesos implicados en el desarrollo de la planta, incluyendo la germinación de la semilla, la determinación de la arquitectura de la planta, la floración, la maduración de frutos y el desprendimiento de las hojas a través del control de la división, expansión, diferenciación y muerte celular (Kucera *et al.* 2005, Bishopp *et al.* 2006, Kepinski 2006). Entre estas fitohormonas están las auxinas, citocininas, giberelinas y ácido abscísico, cada una de las cuales actúa a bajas concentraciones para regular aspectos del crecimiento y desarrollo vegetal. Se ha reportado que otras moléculas tienen la capacidad de alterar la arquitectura de *Arabidopsis*, como es el caso de las alcanidas, cuya aplicación exógena es capaz de inhibir el crecimiento de la raíz primaria y promover la formación de raíces laterales y adventicias (Ramírez-Chávez *et al.* 2004, Campos-Cuevas *et al.* 2008). En el caso particular de la *N*-isobutil decanamida, se induce la formación de estructuras tipo callo sobre las hojas; en la epidermis de hojas maduras tratadas con la alcanida y en los callos inducidos se expresa *CycB1:uidA* en una región mas amplia que en plantas no tratadas. Lo anterior sugiere que las células no salen del ciclo celular en los tiempos del desarrollo normal, dando como resultado divisiones celulares ectópicas. Por lo tanto, las alcanidas pueden alterar varios aspectos de la morfogénesis de las plantas a través del control de la actividad meristemática (López-Bucio *et al.* 2007). En este sentido, se pone de manifiesto que las alcanidas están involucradas en el control del desarrollo de las plantas y para estudiar a fondo dicho control se realizó un escrutinio de aproximadamente 25,000 líneas de semillas mutagenizadas con EMS, sembradas en medio suplementado con *N*-isobutil decanamida, en el que se encontraron 3 mutantes hipersensibles, identificadas por la presencia generalizada de neoplasias en las hojas y tallos, de las cuales solo una sobrevivió hasta la maduración de semillas, a la que se denominó *dhm1* (*decanamide hypersensitive mutant 1*) con fondo genético el fenotipo Col-0 (Pelagio-Flores 2008).

En el presente trabajo se realizó la caracterización de *dhm1*, encontrando que en esta mutante solo se encuentra afectado un gen recesivo, el cual esta involucrado en distintos programas cruciales del desarrollo de la planta como son: a) la germinación,

ya que en *dhm1* disminuye el tiempo necesario para que esta se lleve a cabo, b) la arquitectura del sistema radicular, al observarse un sistema radicular más ramificado en la mutante, y c) la homeostasis en el meristemo apical, a través de modificaciones en la expresión de *CLV3:uidA*.

### 6.3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

Considerando la formación de neoplasias sobre las hojas de plantas tratadas con *N*-isobutil decanamida (López-Bucio *et al.* 2007), aproximadamente 25,000 semillas de *Arabidopsis* mutagenizadas con EMS, previamente esterilizadas, fueron sembradas en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) 0.2X con 60 µM de *N*-isobutil decanamida para realizar un escrutinio a los 14 días después de la germinación buscando individuos con fenotipo de neoplasias generalizadas. A través de éste método se identificaron tres mutantes, sin embargo solo una de ellas sobrevivió en suelo y esta fue nombrada mutante hipersensible a la *N*-isobutil decanamida (*decanamide hypersensitive mutant dhm1*) (Pelagio-Flores 2008).

Para llevar a cabo la caracterización genética de *dhm1*, se realizaron retrocruzas con la línea silvestre Columbia-0 (Col-0), y se calculó la segregación de los fenotipos silvestre e hipersensible en las filiales F1 y F2.

La mutante *drr1* se caracterizó mediante ensayos *in vitro*, en los que se analizó la arquitectura de la raíz y modificaciones en follaje. Para dicho análisis se utilizaron cinco plantas del ecotipo silvestre Col-0 creciendo lado a lado junto a cinco plantas *dhm1* en placas con medio MS 0.2x con 1% de agar, 0.6% de sacarosa y con pH de 7.0, al que se agregaron los distintos tratamientos (*N*-isobutil decanamida, AIA, cinétina, ABA o GA3), teniendo como control el solvente. Cabe señalar que todos los experimentos se realizaron por triplicado. Las placas fueron colocadas en una cámara PERCIVAL AR95L, con temperatura de 22°C, fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad y una inclinación de las placas de 70° durante 10 días, al cabo de los cuales se midió el crecimiento de la raíz primaria y el número de raíces laterales, así como la formación de proliferaciones celulares en el follaje.

Para determinar si existen modificaciones en la expresión endógena de elementos de respuesta primaria a auxinas y citocininas en la mutante *dhm1*, se realizaron cruza de las líneas transgénicas *DR5:uidA* (Ulmasov *et al.*1997) y *ARR5:uidA* (D'Agostino *et al.* 2000) con la *dhm1* para obtener plantas con la construcción *dhm1/DR5:uidA* y *dhm1/ARR5:uidA*; además se llevó a cabo una cruza con *CLV3:uidA* (Brand *et al.* 2002). Las plantas así obtenidas, se sembraron lado a lado en medio MS y a los 8 días después de la germinación (ddg) fueron incubadas con el reactivo X-Gluc, posteriormente se clarificaron y montaron en portaobjetos para su análisis microscópico. Se tomaron fotografías de raíz y follaje, en donde se midieron la longitud y el ancho del meristemo de raíz, así como áreas celulares en ambas estructuras.

### 6.3.5. RESULTADOS

#### 6.3.5.1. Caracterización genética de la mutante hipersensible a la *N*-isobutil decanamida (*dhm1*)

El análisis genético para determinar la naturaleza de la mutación se realizó mediante la segregación del fenotipo mutante en las poblaciones F1 y F2, en donde se observó que el fenotipo *dhm1* segrega en la proporción mendeliana correspondiente a un gen recesivo. La F1 de la retrocruza mostró fenotipo silvestre, mientras que en la F2 se obtuvo una tasa de segregación de tres plantas con fenotipo silvestre por cada una con fenotipo mutante ( $\chi^2 = 0.246 < \chi^2_{0.95} = 3.841$ ), como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Tasa de segregación de la progenie de la cruza entre plantas mutante *dhm1* y silvestre Col-0

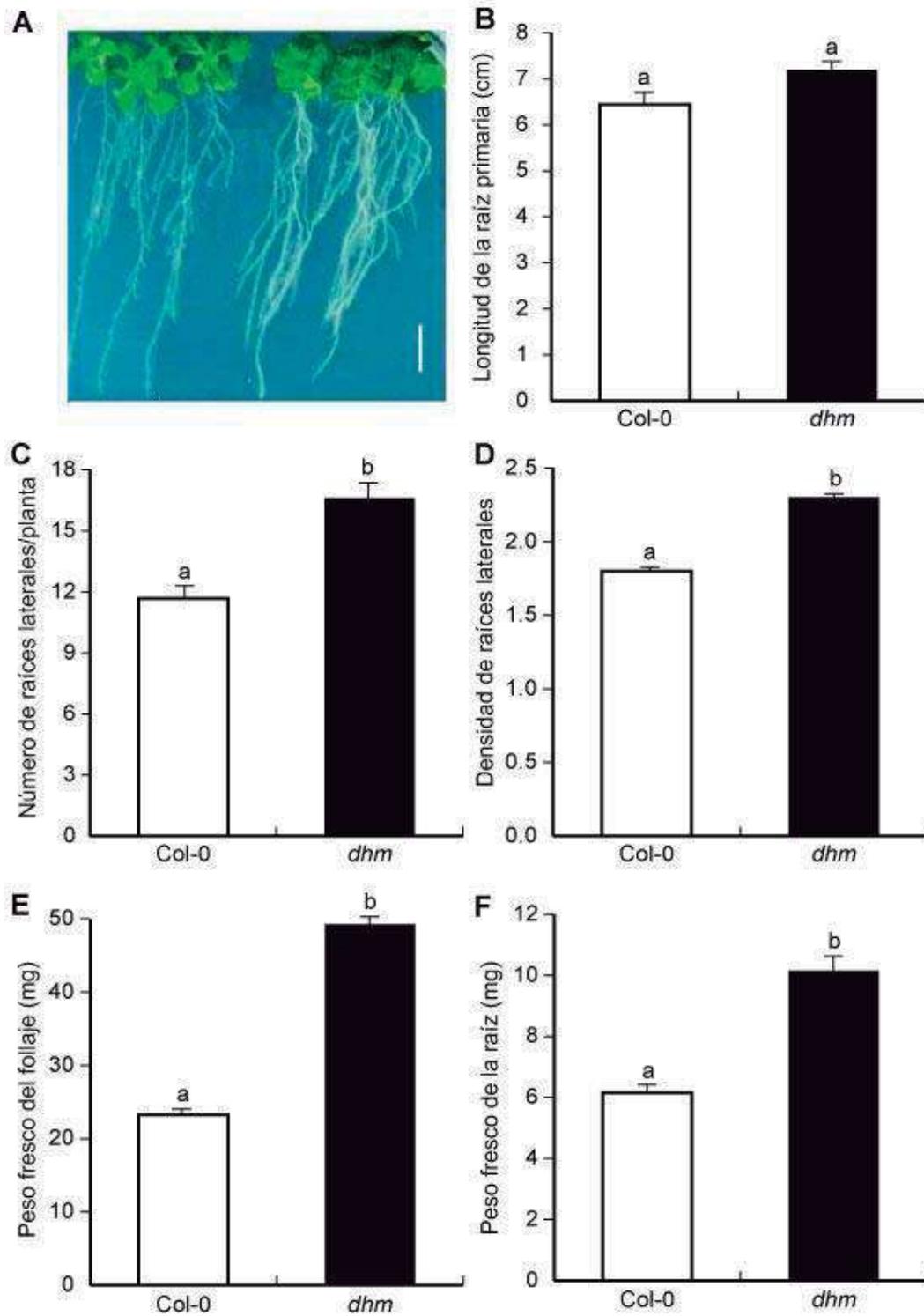
Generación	Fenotipo de la progenie		Tasa obtenida Wt: <i>dhm1</i>	Tasa probada Wt:Mutante	$\chi^2$ <sup>a</sup>
	Hojas normales (WT)	Hojas neoplásicas ( <i>dhm1</i> )			
F <sub>1</sub>	46	0			
F <sub>2</sub>	175	54	3.24:1	3:1	2.46

<sup>a</sup>Con un grado de libertad y un valor crítico de 5%, la hipótesis nula es aceptada si  $\chi^2$  es menor a 3.841.

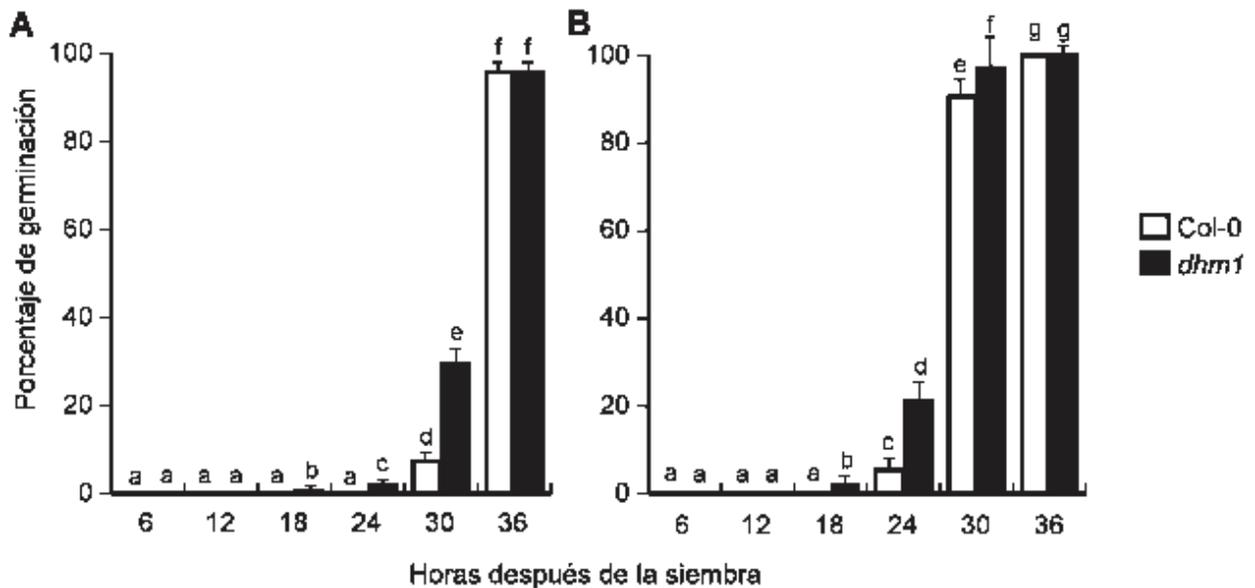
### 6.3.5.2. Desarrollo de la mutante *dhm1 in vitro*

Para estudiar las alteraciones en el desarrollo de la mutante *dhm1* se sembraron cinco semillas de plantas silvestres (Col-0) creciendo al lado de cinco semillas de plantas *dhm1* por placa con medio MS 0.2X, en total se sembraron cinco placas. Se observaron raíces primarias de tamaño similar en Col-0 y *dhm1* (Figura 1-B), pero la mutante produce un mayor número de raíces laterales (16 en *dhm1*, comparado con 12 en Col-0, Figura 1-C), por lo cual su densidad es significativamente mayor (Figura 1-C y 1-D). En general las plantas mutantes son de mayor tamaño, lo cual se ve reflejado en el peso fresco del follaje y de la raíz (Figura 1-E y F). Además, las mutantes mostraron neoplasias sobre los cotiledones, hipocotilos y hojas.

Al realizar el experimento que se acaba de describir, se observó que existen diferencias en el tiempo de germinación de la planta silvestre con respecto a la mutante, por lo que se determinó el tiempo de germinación de ambas líneas en medio MS 0.2X, sembrando semillas con 72 horas de vernalización y semillas sin vernalizar, sembrando 50 semillas Col-0 al lado de 50 semillas *dhm1* por placa por tratamiento, por triplicado. Se determinó el porcentaje de germinación, contando el número de semillas en la que la radícula hubiese emergido fuera de la testa, visible con un aumento de 30X en un microscopio estereoscópico Leica MZ6, cada 6 horas a partir de la siembra. Se encontró que las semillas sin vernalizar inician su germinación a las 30 horas para Col-0 comparado con *dhm1* que empieza este proceso desde las 18 horas (Figura 2-A), mientras que en semillas con 72 horas de vernalización, Col-0 inicia a las 24 horas y *dhm1* a las 18 (Figura 2-B), lo que indica que el gen afectado en *dhm1* esta directamente implicado en la germinación.



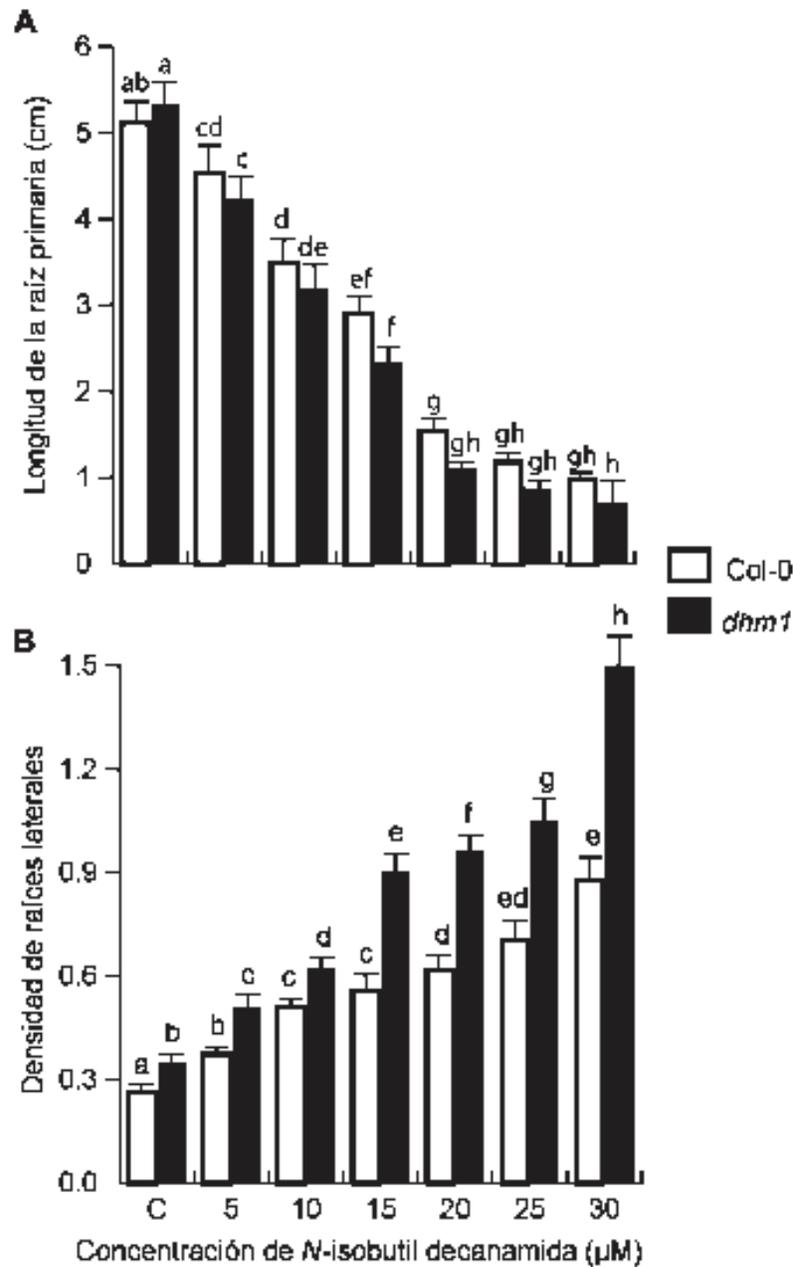
**Figura 1. Desarrollo de *dhm1* en medio MS.** A) Plantas de 7 días después de la germinación (ddg), a la derecha Col-0 y a la izquierda *dhm1*. B) Longitud de la raíz primaria. C) Número de raíces laterales. D) Densidad de raíces laterales. E) Peso fresco del follaje. F) Peso fresco de la raíz a los 7 ddg. Las barras representan el error estándar y letras diferentes representan diferencias significativas  $P < 0.001$ . (n=25 plantas por línea).



**Figura 2. Modificación en el tiempo de germinación de *dhm1*.** A) Semillas sin vernalizar, donde a las 30 horas se observa un porcentaje de germinación 4 veces mayor para *dhm1*. B) Semillas con 72 horas de vernalización, donde a las 24 horas se observa un porcentaje de germinación 3 veces mayor para *dhm1*. Las barras representan el error estándar y letras diferentes representan diferencias significativas  $P < 0.001$ . (n=150 semillas por línea).

### 6.3.5.3. Respuesta de *dhm1* a la *N*-isobutil decanamida

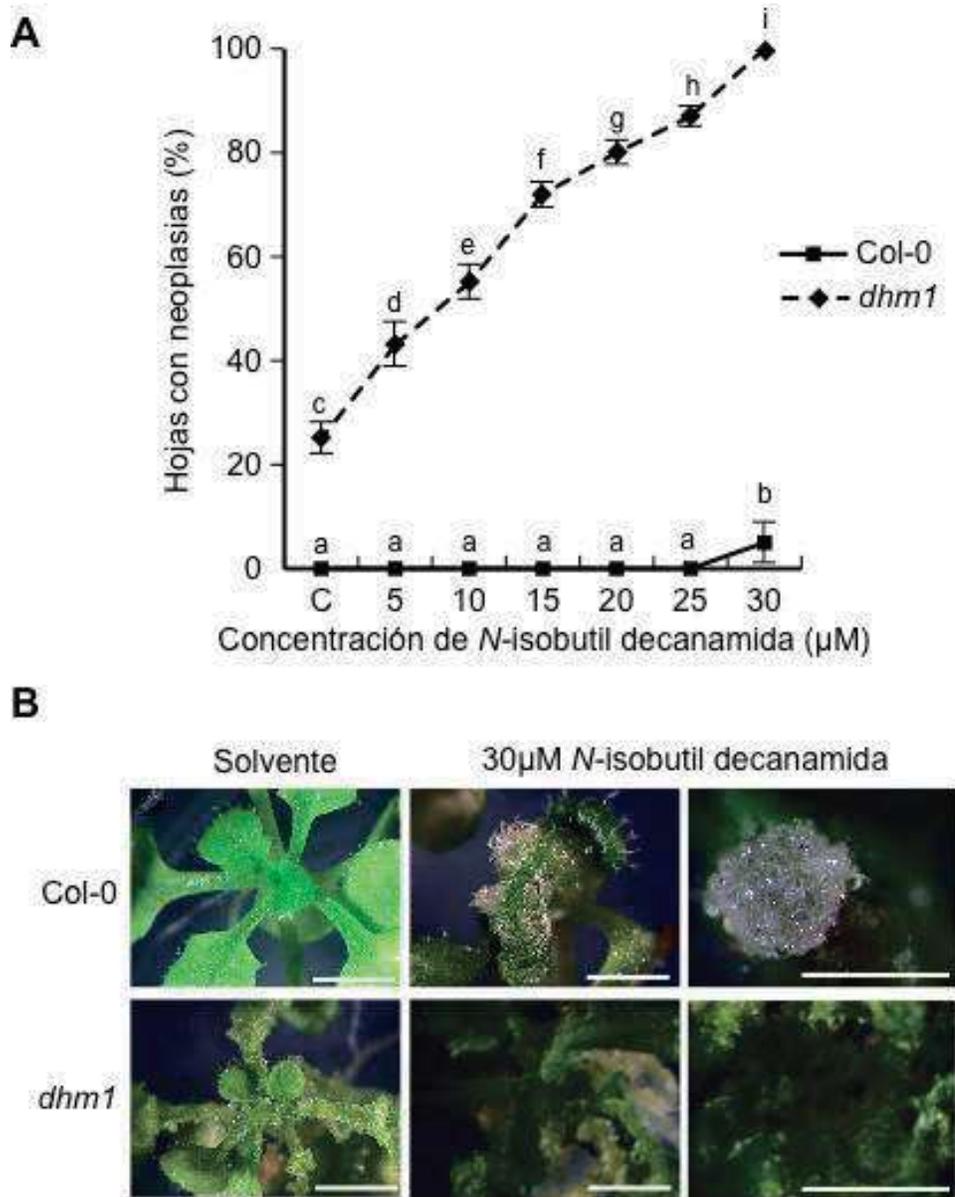
Se evaluó la respuesta de *dhm1* a la *N*-isobutil decanamida, para lo cual se sembraron lado a lado cinco plantas Col-0 y cinco *dhm1* en medio MS 0.2X suplementado con concentraciones crecientes de *N*-isobutil decanamida. Al comparar la arquitectura de la raíz de la mutante *dhm1*, se observa que existe una inhibición del crecimiento de la raíz primaria similar, con una mayor inducción de raíces laterales en *dhm1* respecto a Col-0. En las plantas silvestres existe una inhibición cercana al 75% con 30  $\mu$ M de *N*-isobutil decanamida, mientras en *dhm1* alcanza hasta un 85% (Figura 3-A). El efecto de la alcamida es mas patente sobre la densidad de raíces laterales, ya que desde los controles existen diferencias significativas que se ven incrementadas dependiendo de la concentración, en ambas líneas existe una inducción en la formación de raíces laterales, sin embargo esta inducción es mayor para *dhm1* (Figura 3-B).



**Figura 3. Respuesta de *dhm1* a la *N*-isobutil decanamida en arquitectura de raíz.** A) Longitud de la raíz primaria y B) Densidad de raíces laterales en respuesta a la alcamida a los 7 ddg. Las barras representan el error estándar y letras diferentes representan diferencias significativas  $P < 0.001$ . (n=15 plantas por línea por tratamiento).

Además, se observaron diferencias en la formación de estructuras neoplásicas sobre el follaje, por lo que se tomaron fotografías de las hojas y se evaluó el porcentaje de la hoja en el que existían estas neoplasias mediante el programa Image Tool. A partir

de estas fotografías se determinó que la adición de la *N*-isobutil decanamida al medio de cultivo es directamente proporcional a la formación de neoplasias en las hojas de *dhm1* (Figura 4). Por lo que es posible concluir que *dhm1* es hipersensible a la *N*-isobutil decanamida.



**Figura 4. Efecto de la *N*-isobutil decanamida sobre el follaje de *dhm1*.** A) Porcentaje de la hoja en la que se observan neoplasias. B) Fotografías representativas de las plantas silvestres y *dhm1* solo con el solvente y con 30 µM de *N*-isobutil decanamida a los 14 ddg. Las barras de error representan el error estándar y letras diferentes representan diferencias significativas  $P < 0.001$ . ( $n = 15$  fotografías por línea por tratamiento).

#### 6.2.5.4. Interacción de *dhm1* con la mutante *tumorous shoot development 2* (*tsd2*)

Existe una serie de mutantes recesivos de *Arabidopsis thaliana* que desarrollan tejido tumoral desorganizado en las hojas y tallos dando como resultado estructuras verdes tipo callo, denominadas *tumorous shoot development* (*tsd1*, *tsd2* y *tsd3*). La mutante *tsd2* presenta una adhesión celular reducida, la división celular alterada en las capas L2 y L3 del meristemo del follaje, incremento en la actividad axial de los meristemas y un crecimiento celular reducido, TSD2 es una metiltransferasa con un papel esencial en la adhesión celular y el desarrollo coordinado de la planta (Frank *et al.* 2002, Krupková *et al.* 2007). Debido a la similitud fenotípica que existe entre *dhm1* y *tsd2* era probable que ambas mutantes fuesen alélicas, por lo que se realizó una cruce entre ambas mutantes, obteniendo solo plantas con fenotipo silvestre en la F1 y en la F2 una relación 0.56 plantas silvestres por cada planta con hojas neoplásicas ( $\chi^2 = 14.22 > \chi^2_{0.95} = 3.841$ ) (Tabla 2), lo que sugiere que ambas mutaciones afectaron distintos genes.

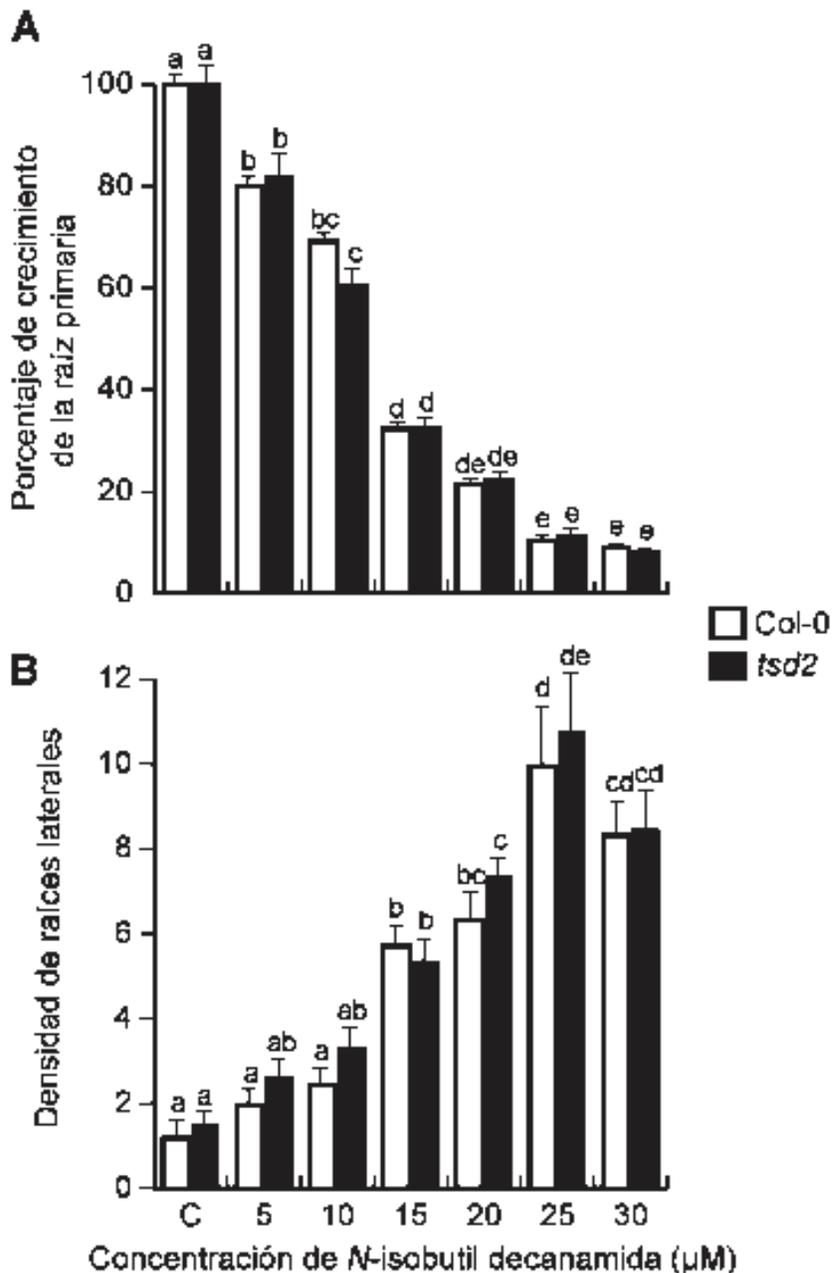
Tabla 2. Tasa de segregación de la progenie de la cruce entre plantas mutante *dhm1* y *tumorous shoot development 2* (*tsd2*)

Generación	Fenotipo de la progenie		Tasa obtenida Wt:Mutante	Tasa probada Wt:Mutante	$\chi^2_{2a}$
	Hojas normales (WT)	Hojas neoplásicas (Mutante)			
<b>F<sub>1</sub></b>	43	0			
<b>F<sub>2</sub></b>	78	138	0.56:1	3:1	14.22

<sup>a</sup>Con un grado de libertad y un valor crítico de 5%, la hipótesis nula es aceptada si  $\chi^2$  es menor a 3.841.

Además, se determinó la arquitectura de raíz de la mutante *tsd2* tratada con concentraciones crecientes de *N*-isobutil decanamida, en un diseño igual al empleado para determinar el efecto de la alcanamida sobre *dhm1*, encontrando que la respuesta de *tsd2* a la alcanamida es igual que la respuesta de las plantas silvestres en

la inhibición del crecimiento de la raíz primaria (Figura 5-A), en la inducción de las raíces laterales (Figura 5-B) y en el follaje no se observó incremento de las estructuras neoplásicas. Esto confirma que el gen afectado en *dhm1* es distinto a *TSD2*.



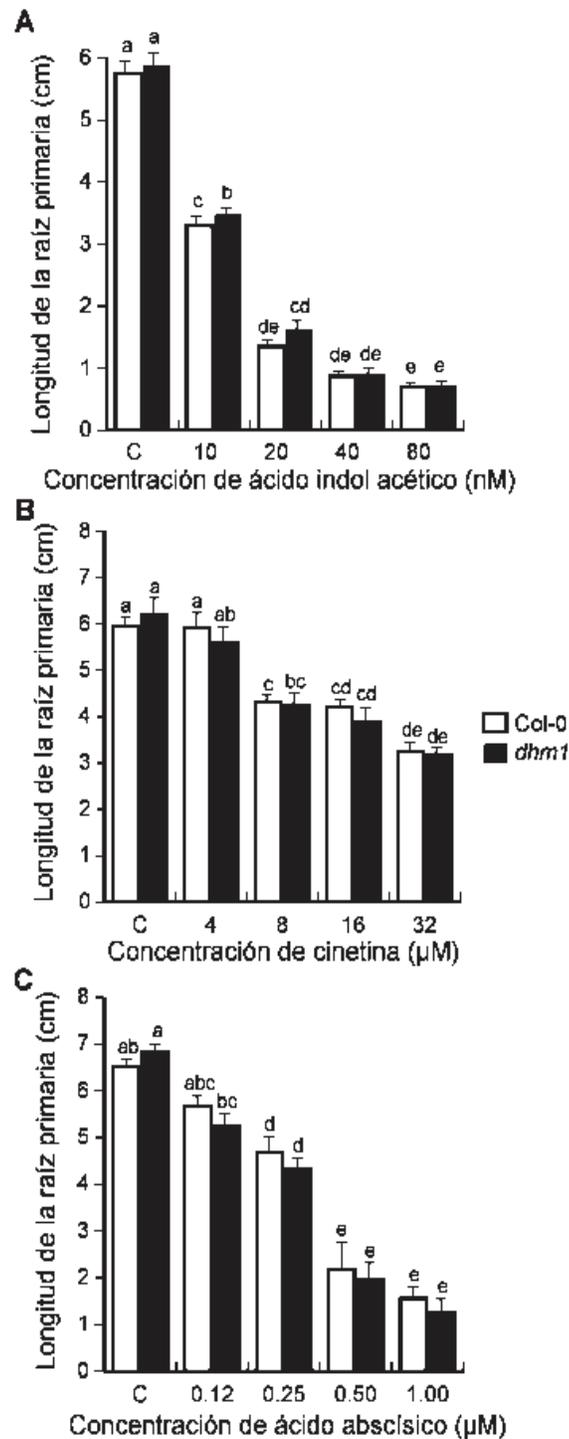
**Figura 5. Efecto de la *N*-isobutil decanamida sobre la arquitectura de raíz de *tsd2*.** A) Porcentaje de crecimiento de la raíz primaria y B) Densidad de raíces laterales en respuesta a la alcamida a los 7 ddg. Las barras representan el error estándar y letras diferentes representan diferencias significativas  $P < 0.001$ . (n=15 plantas por línea por tratamiento).

### 6.3.5.5. Respuesta de *dhm1* a auxinas, citocininas, ABA y GA3

Para determinar si las alteraciones morfológicas mostradas en *dhm1* dependen directamente de alguna fitohormona se analizó el crecimiento de la raíz primaria de *dhm1* en respuesta a la aplicación exógena de AIA, kinetina, ABA y GA3 en experimentos independientes, creciendo lado a lado plantas mutantes con su parental silvestre (Col-0).

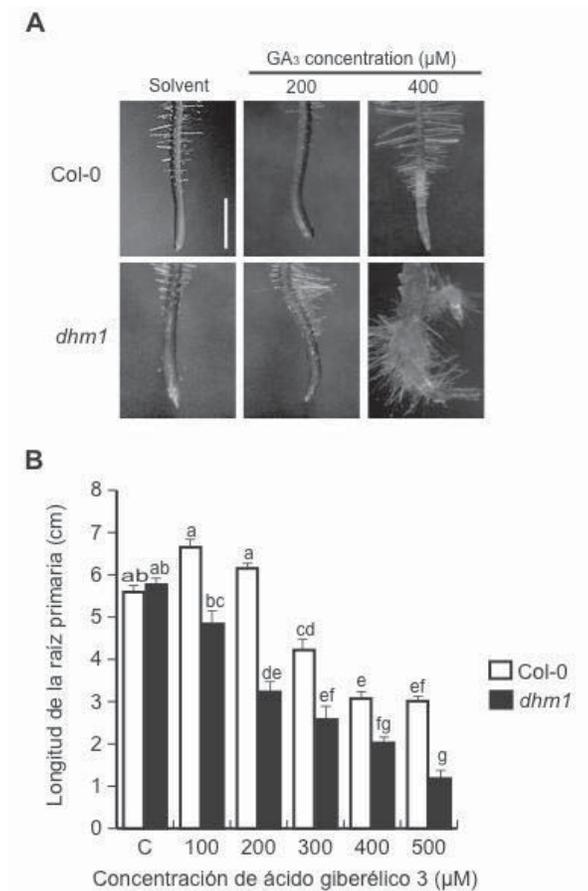
La principal auxina en las plantas es el ácido indol-3-acético (AIA), el cual actúa como señal para los procesos de división, elongación y diferenciación celular, también regula la formación y emergencia de raíces laterales, así como la organización de los meristemas (Ljung *et al.* 2001, Bishopp *et al.* 2006). Al aplicar AIA en el medio de cultivo, las plantas Col-0 muestran una inhibición de 40% con 10 nM y 80% con 80 nM, obteniéndose la misma respuesta en *dhm1* (Figura 6-A), lo que indica que la percepción de AIA no está modificada en *dhm1*.

Dado que la triple mutante afectada en los genes que codifican para receptores de citocininas (*cre1-12/ahk2-3/ahk3-3*) es resistente a la aplicación exógena de *N*-isobutil decanamida, puede existir un cruce de señales entre alcalamidas y citocininas. El posible escenario sería que los receptores de citocininas sean los blancos directos de las alcalamidas o bien que las alcalamidas pudieran alterar la sensibilidad a las citocininas en tejidos específicos (López-Bucio *et al.* 2007). A continuación se analizó la respuesta de *dhm1* a la aplicación endógena de cinétina, encontrando que no existen diferencias significativas entre la respuesta del crecimiento de la raíz primaria de la planta silvestre y el de la mutante *dhm1* (Figura 6-B). Lo anterior muestra que en la mutante hipersensible a *N*-isobutil decanamida no existe una alteración en la sensibilidad a la cinétina. También se determinó la respuesta de *dhm1* a la aplicación exógena de ácido abscísico, encontrando que la mutante responde de manera similar a Col-0 (Figura 6-C), por lo que concluimos que tampoco existe alteración en la percepción de ABA por *dhm1*.



**Figura 6. Efecto de los reguladores del crecimiento vegetal ácido indol acético, cinetina y ácido abscísico sobre el crecimiento de la raíz primaria de *dhm1*.** A) Efecto del ácido indol acético, B) Efecto de cinetina y C) Efecto del ácido abscísico a los 7 ddg. En los tres casos se muestra que la respuesta de la mutante *dhm1* es muy similar al de la silvestre, por lo que la percepción de estos compuestos no está afectada en *dhm1*. Las barras representan el error estándar y letras diferentes representan diferencias significativas  $P < 0.001$ . (n=15 plantas por línea por tratamiento).

Interesantemente, al probar el crecimiento de la raíz primaria de *dhm1* con el ácido giberélico 3 (giberelina bioactiva) a los 4 días después de la germinación se observa que a una concentración de 200  $\mu\text{M}$  el meristemo es mayor que en el control que solo tiene al solvente y con 400  $\mu\text{M}$  este es menor en Col-0, mientras que en *dhm1* en ambos casos se observa un meristemo mas pequeño que el control, siendo menor en la concentración mas alta (Figura 7-A). Este efecto se mantiene a los 7 días, ya que mientras la planta silvestre responde a esta fitohormona con una mayor longitud de la raíz primaria a concentraciones de 100 y 200  $\mu\text{M}$ , seguida por una reducción de este mismo parámetro en concentraciones mayores, en la mutante *dhm1* muestra solo el efecto represor (Figura 7-B), sugiriendo que existe una interacción entre la vía de giberelinas y la de alcamidas.

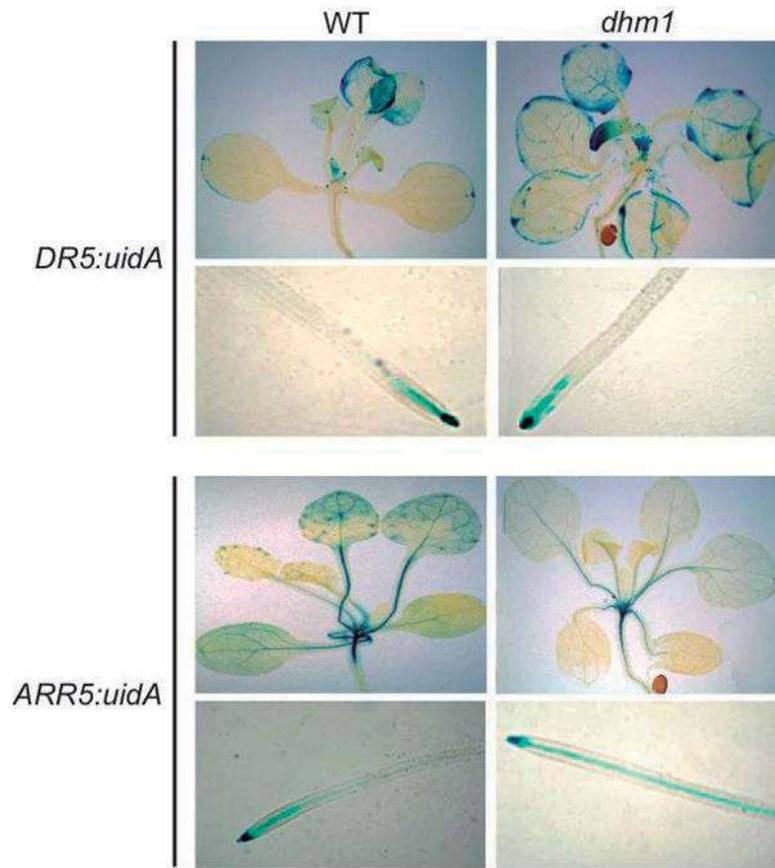


**Figura 7. Efecto del ácido giberélico 3 sobre el crecimiento de la raíz primaria de *dhm1*.** A) Fotografías representativas de las plantas silvestres y *dhm1* con el solvente, 200 y 400  $\mu\text{M}$  de GA3 a los 4 ddg. B) Efecto de GA3 sobre el crecimiento de la raíz primaria a los 7 ddg. Las barras de error representan el error estándar y letras diferentes representan diferencias significativas  $P < 0.001$ . (n=15 plantas por línea por tratamiento).

#### 6.3.5.6. Expresión de *DR5* y *ARR5* en *dhm1*

Ramírez-Chávez y colaboradores (2004) mostraron que la expresión del marcador de respuesta a auxinas *DR5:uid* es similar al control cuando las plantas son tratadas con alcanidas, por lo que estas moléculas no inducen la expresión de genes de respuesta a auxinas en *Arabidopsis*. Sin embargo, como aún no se determinaba si en *dhm1* existían cambios intrínsecos en la expresión de este gen regulado por auxinas, se realizó la transferencia del marcador *DR5:uidA* a *dhm1* y se observaron sus patrones de expresión, encontrando que son similares a los del control (Figura 8). Dichos patrones de expresión del marcador fueron similares a los reportados por Aloni y colaboradores (2003), lo que indica que no existen modificaciones en la inducción por auxinas. Aun cuando los patrones de expresión de *DR5* son similares entre plantas silvestres y mutantes, se observa una diferencia importante entre ambas líneas: el mayor número de hojas en la mutante *dhm1*.

En el caso de *ARR5:uidA*, se había reportado que este marcador inducible por citocininas, altamente específico, es inducido por la *N*-isobutil decanamida de manera diferente a como lo hacen las citocininas. En el tratamiento con la alcanida la expresión se observó en cotiledones, en la punta de la raíz primaria, en raíces adventicias y primordios de las raíces laterales, que son tejidos en los que hay proliferación celular. Sin embargo, no se induce en la región central de la raíz ni en la unión entre el tallo y la raíz (López-Bucio *et al.* 2007). Es por ello que resultaba de primordial interés determinar si existen modificaciones en la expresión de *ARR5:uidA* en la mutante *dhm1*, para lo cual se realizó la transferencia de este marcador a la mutante, encontrando que existe una expresión disminuida en el follaje, mientras se incrementa en la raíz primaria (Figura 8), lo que significa que la alcanida regula la localización de la expresión de los genes de respuesta primaria a citocininas y posiblemente este sea uno de los mecanismos a través de los cuales ejerce su efecto sobre la planta

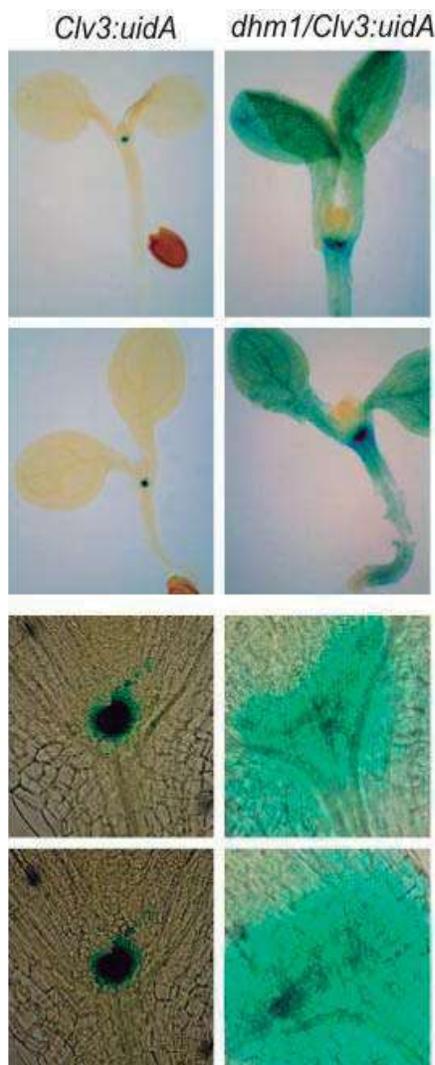


**Figura 8. Efecto de la mutación en *dhm1* sobre la expresión de *DR5:uidA* y *ARR5:uidA*.** Se observa que la tinción de GUS para *DR5* es muy similar en las hojas de plantas silvestres y en las mutantes *dhm1*. En esta última existe un mayor número de estas, en la raíz primaria no se observan diferencias. En el caso de *ARR5*, se observa una menor tinción de GUS en el follaje de la planta mutante que en el de la silvestre y ocupa un mayor espacio en la raíz de *dhm1*. Plantas procesadas a los 8 d.d.g.

### 6.3.5.7. Modificaciones en la expresión de *CLV3* en *dhm1*

Al observar el fenotipo de *dhm1*, se puede apreciar un mayor número de hojas a los 8 ddg. Esto fue particularmente notable en la línea *dhm1/DR5:uidA* por lo que resulta de suma importancia determinar si *CLV3*, uno de los genes involucrados en el control las células madre en el meristemo apical (Jun *et al.* 2007), presenta alguna alteración en su expresión bajo el fondo de la mutación *dhm1*. Para ello, se realizó la transferencia del marcador a la mutante y posteriormente la tinción con X-Gluc. Se puede observar claramente que en la planta transgénica *CLV3:uidA* la expresión de GUS esta restringida a una zona específica del SAM (Clark *et al.* 1997), mientras que

en la mutante *dhm1* existe una expresión ectópica, que incluye a los cotiledones y el hipocotilo, lugares en donde se observa la proliferación de estructuras neoplásicas. Además, al hacer un acercamiento, se puede notar que en la zona de expresión normal esta extendida la expresión de GUS para la mutante (Figura 9). Es importante señalar que esta expresión solamente se observa a los 4 ddg, ya que posteriormente no es visible. Los resultados anteriores sugieren que las alcanidas son capaces de controlar la expresión de este péptido señal en las primeras fases del desarrollo postembrionario, lo que explicaría que estas plantas puedan continuar con su desarrollo y perder las neoplasias en estados de desarrollo tardíos.

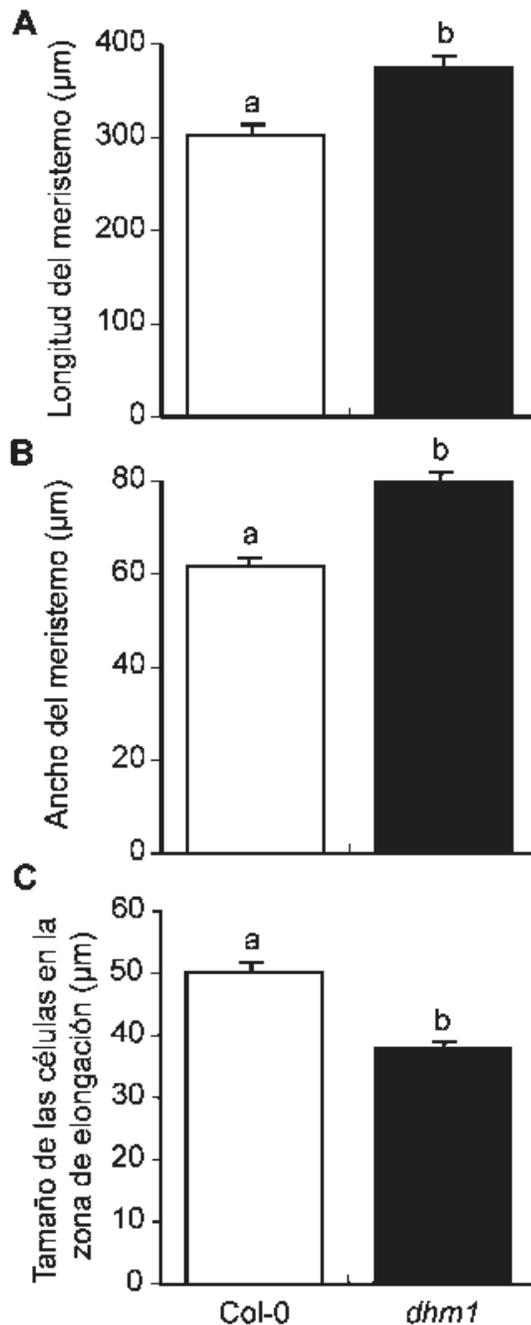


**Figura 9. Patrones de expresión de *CLV3:uidA* en plantas transgénicas y construcciones con *dhm1*.** Se observa que la tinción de GUS para *CLV3* se localiza en una zona específica del meristemo, mientras que en la mutante *dhm1*, existe una expresión ectópica de este marcador, que incluye a los cotiledones e hipocotilo.

#### **6.3.5.8. Alteraciones del tamaño celular en *dhm1***

El fenotipo de la mutante *dhm1* muestra que son plantas de mayor tamaño con raíces ramificadas *in vitro*, para determinar si el incremento en el tamaño de la planta está relacionado con células más grandes y por tanto implicado un proceso de expansión celular o bien con un mayor número de células pequeñas, relacionado con un incremento en la proliferación celular, se realizó un examen de las estructuras celulares. A partir de plantas silvestres y mutantes creciendo en medio MS 0.2X a los ocho ddg, se realizó un clareo de tejidos, seguido del montaje del material en preparaciones semipermanentes, de las cuales se tomaron 15 fotografías por estructura a analizar por línea con el objetivo de 40X en un microscopio. Posteriormente, estas fotografías fueron medidas a través de los programas ImageJ e Image Tool, en caso de la longitud y área de las células se midieron 15 células de cada fotografía analizada.

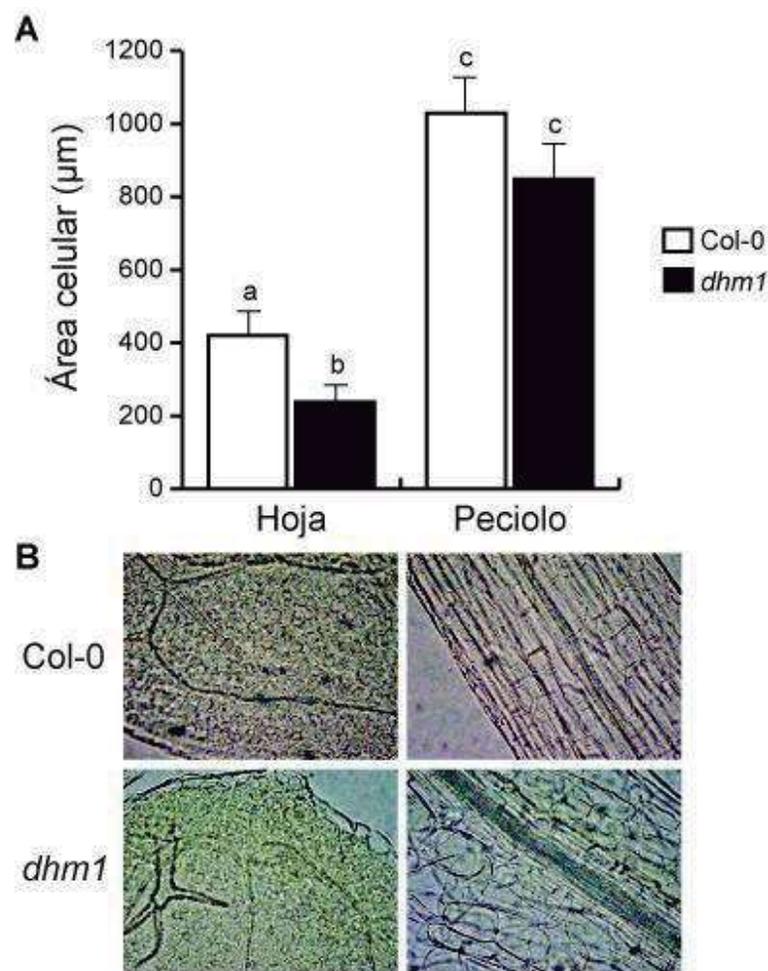
Para la raíz primaria, se midieron la longitud y el ancho de los meristemas, encontrando que ambos parámetros son mayores para la mutante *dhm1* (Figura 10-A y B), mientras que las células en la zona de elongación son más pequeñas en la mutante (Figura 10-C).



**Figura 10. Modificaciones celulares en la raíz de *dhm1*.** A) Longitud del meristemo. B) Ancho del meristemo. C) Longitud de las células en la zona de elongación. Se puede notar que el meristemo de *dhm1* es más largo y ancho, mientras que las células de la zona de elongación son más pequeñas. Las barras de error representan el error estándar y letras diferentes representan diferencias significativas  $P < 0.001$ . (n=15 plantas por línea).

De manera similar, las células de la hoja de la mutante mostraron un área menor que las de Col-0 (Figura 11), lo que indica que las alteraciones en el tamaño de *dhm1*

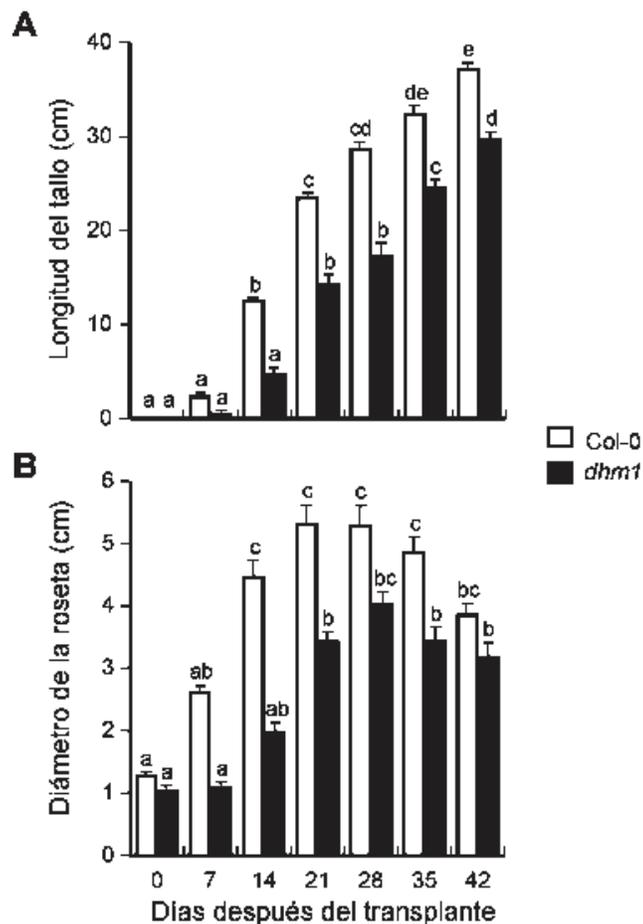
están determinadas por una mayor proliferación celular. En el caso de los peciolo, si bien no existen diferencias significativas, hay una tendencia en el sentido de que en la mutante se encuentran células mas pequeñas. Sin embargo, en este punto es importante resaltar que mientras en los peciolo de Col-0 se observa una estructura de células ordenadas en filas, en *dhm1* dicha organización se encuentra alterada, mostrando que las células pierden la forma rectangular necesaria para formar las filas en Col-0, encontrando distintas formas y tamaños celulares en la mutante, lo que sugiere que tal desorganización celular podría estar relacionada con la formación de neoplasias en los cotiledones.



**Figura 11. Área celular de hoja y peciolo en *dhm1*.** A) Área de las células que conforman las hojas y peciolo de la planta silvestre Col-0 y en la mutante *dhm1*. B) Fotografías representativas de la estructura celular en hoja y peciolo de Col-0 y la mutante. Las barras de error representan el error estándar y letras diferentes representan diferencias significativas  $P < 0.001$ . ( $n = 15$  plantas por línea por tratamiento).

### 6.3.5.9. Desarrollo de la mutante *dhm1* en suelo

Para analizar las alteraciones de la mutante *dhm1* en suelo, se realizó el transplante de 5 plantas silvestres y 5 plantas mutantes a charolas con suelo, por triplicado, a las que se midió la longitud del tallo y el diámetro de la roseta cada semana. Se observó que en la planta silvestre el tallo aparece a los 7 días después del transplante (ddt) y continúa su crecimiento hasta la sexta semana. Lo mismo ocurre con el tallo de la mutante, sin embargo existen diferencias en el tamaño de esta estructura, mientras que en Col-0 llega a los 38 cm, en *dhm1* solo alcanza los 30 cm (Figura 12-A). De forma similar, la roseta es mas pequeña en la mutante (Figura 12-B), dando como resultado plantas mutantes *dhm1* mas pequeñas que las plantas normales.



**Figura 12. Ciclo de vida de la mutante *dhm1* en suelo.** A) Longitud del tallo. B) Diámetro de la roseta de Col-0 comparado con *dhm1*. Se puede observar que esta mutante es mas pequeña que la planta silvestre. Las barras representan el error estándar y letras diferentes representan diferencias significativas  $P < 0.001$ . (n=15 plantas por línea).

Resulta importante mencionar que en el momento del trasplante las hojas de la mutante presentaban neoplasias y en la primera semana estas hojas entraron en un proceso de senescencia, siendo reemplazadas por hojas nuevas sin estas estructuras. Es probable que el pequeño retraso en la aparición del tallo se deba a este proceso de recuperación.

### 6.3.6. DISCUSION

La caracterización de una segunda mutante afectada en la respuesta morfogénica a la *N*-isobutil decanamida, da mayor soporte a la hipótesis de que la percepción de la alcanamida esta regulada por mecanismos genéticos en *A. thaliana* y que la correcta percepción de la alcanamida es necesaria para el desarrollo normal de la planta. En general, *dhm1* muestra varias alteraciones en su morfología, como son el incremento en número y densidad de raíces laterales, la presencia generalizada de neoplasias sobre las hojas, el incremento en el peso fresco tanto de follaje como de raíz, lo cual indica que se trata de un gen crucial en el desarrollo de la planta.

En este caso se trata de una mutante hipersensible a alcanamidas, cuya característica más distintiva es la proliferación de estructuras neoplásicas sobre las hojas. La *N*-isobutil decanamida es la única molécula conocida que por sí misma es capaz de inducir estas estructuras tipo callo (López-Bucio *et al.* 2007), las cuales son más conspicuas al agregar la alcanamida al medio de cultivo de la mutante *dhm1* (Figura 4). Ningún otro de los fitoreguladores probados (AIA, cinétina, ABA, GA3) produjo este tipo de estructuras. Esto indica que la mutante es específicamente hipersensible a la alcanamida. Existe un grupo de mutantes con fenotipo similar, denominadas *tumorous shoot development (tsd)*, las cuales fueron aisladas en un medio libre de hormonas buscando plantas que presentasen desdiferenciación y crecimiento independiente de citocininas. Estas plantas pueden mantenerse indefinidamente *in vitro* como callos verdes poco diferenciados. (Frank *et al.* 2002). Esta es una diferencia con *dhm1*, la cual aun cuando presenta estructuras tipo callo, no puede ser mantenida indefinidamente *in vitro*, debido a que antes de la emergencia del tallo floral las hojas

neoplásicas son reemplazadas por hojas nuevas sin estas estructuras y en el caso de estar ampliamente generalizadas, la planta muere.

De acuerdo a la caracterización de las mutantes *tsd*, los genes TSD son necesarios en la organización estructural del cuerpo de la planta, presuntamente a través de la regulación negativa de citocininas en el SAM (Frank *et al.* 2002). Esto es similar a lo que ocurre en *dhm1*, ya que las células se encuentran desorganizadas, principalmente en los peciolos (Figura 11), aunque este efecto de desorganización celular también había sido reportado como respuesta en las plantas tratadas con NAE 12:0, en las que las células presentaban forma irregular, asociada a deficiencias en la formación de la pared celular, el arreglo de los microtúbulos y el tráfico de membranas (Blancaflor *et al.* 2003). El mismo efecto se manifiesta en el tratamiento con afinina (Ramírez-Chávez *et al.* 2004), lo que sugiere que las amidas lipídicas están implicadas en la organización celular en la planta, particularmente del follaje.

Es importante señalar que cuando la planta es transferida a suelo, las hojas con estructuras neoplásicas mueren y son reemplazadas por hojas nuevas en las que no se aprecian este tipo de alteraciones, continuando con un ciclo de vida normal. Así que las principales alteraciones relacionadas con el gen afectado en *dhm1*, se presentan principalmente en los estadios tempranos del desarrollo de la planta. Sin embargo, quedan secuelas en el desarrollo tardío de *dhm1*, dando como resultado plantas más pequeñas que la planta silvestre (Figura 12). De manera similar, *TSD2* se expresa principalmente en los meristemas y hojas jóvenes, y es una planta más pequeña (Krupkova *et al.* 2007). Considerando tanto diferencias como semejanzas entre las mutantes *tsd2* y *dhm1*, es posible que se encuentren en una misma vía de señalización, aun cuando *tsd2* responde igual que la planta silvestre a la *N*-isobutil decanamida y ambas mutantes están afectadas en distintos genes.

Considerando que la característica más relevante de esta mutante se encuentra en el follaje, se realizó la transferencia de *CLV3:uidA* (Brand *et al.* 2002) a *dhm1*, encontrando en la mutante una expresión ectópica de GUS, en cotiledones e hipocotilo (Figura 9), donde se desarrollan las neoplasias. *CLV3* es un polipéptido que controla el reservorio de células madre en el SAM, restringiendo la proliferación

celular, a través de un “loop” de regulación negativo asociado a *WUS* (Clark *et al.* 1996, Fletcher *et al.* 1999, Jun *et al.* 2007, Suzaki *et al.* 2008). *WUS* promueve la actividad proliferativa de las células madre. *CLV3* es una proteína cuya localización en el apoplasto es necesaria para su función, al unirse al complejo *CLV1/CLV2*, donde se activa (Rojo *et al.* 2002). Lo cual lleva a suponer que la expresión ectópica de *CLV3*, que se observa difusa en la planta disminuye su acción sobre *WUS*, ya sea por no poder unirse al complejo receptor o por no estar en el apoplasto, permitiendo la proliferación celular. Esta proliferación celular es inducida por citocininas a través de la familia de genes *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR* (ARRs), los cuales interactúan directamente con el “loop” *CLV/WUS*, a través de la vía de señalización mediada por citocininas (Leibfried *et al.* 2005, Linsay *et al.* 2006).

Los resultados obtenidos en la caracterización de la mutante hipersensible a la alcanida reflejan que la mutación en *dhm1* es altamente pleiotrópica. Esto sugiere que se trata de un gen capaz de regular a otros, probablemente a través de un sistema de señalización de dos componentes relacionado a citocininas. Se ha demostrado que la *N*-isobutil decanamida es capaz de inducir la expresión del gen de respuesta primaria a citocininas *ARR5:uidA*. Esta molécula requiere de los receptores de citocininas para ejercer su efecto sobre *A. thaliana* (López-Bucio *et al.* 2007). Se conoce que la vía de señalización de las citocininas es regulada por un sistema de dos componentes que incluye a los receptores *CRE1* y *AHK4*. Estos receptores son similares a His cinasas, proteínas que transfieren fósforo y contienen His (AHPs) y reguladores de genes de respuesta (ARRs) (Hutchison y Kieber 2002). La posibilidad de que los receptores de citocininas sean el blanco de la alcanida, propuesto por López-Bucio y colaboradores (2007) es mínima, ya que la mutante hipersensible a la alcanida tiene una respuesta similar a Col-0 cuando se aplica exógenamente cinetina (Figura6-B). Sin embargo, cuando se realiza la transferencia del gen de respuesta primaria a auxinas *ARR5:uidA* a *dhm1*, existe una menor expresión de *GUS* (Figura 8), lo que indica claramente que la alcanida altera la respuesta a citocininas en la planta y a través de esta modificación ejerce su efecto en el desarrollo.

Considerando que las citocininas están involucradas en distintos procesos a través del ciclo de vida, incluyendo el control de las células madre tanto en raíz como en follaje, la biogénesis de cloroplastos, la diferenciación vascular, el crecimiento y ramificación de raíz, tallo e inflorescencias, el balance de nutrientes, la senescencia de las hojas, la tolerancia al estrés y el desarrollo de la semilla (Shakakibara 2005, Müller y Sheen 2007), puede considerarse que, al menos una gran parte de las respuestas de la planta a las alcaloides podrían estar determinadas por la modificación en la vía de las citocininas.

Por ejemplo, la mutante *dhm1* muestra incremento en el tamaño del meristemo y reducción en el tamaño de las células de la zona de elongación (Figura 10), relacionado con un incremento en la proliferación celular, ya que el tamaño de la raíz es determinado por el número de células en división y el tamaño final de las células (Beemster *et al.* 2003). Se ha demostrado que las citocininas determinan el tamaño del meristemo al controlar el ritmo de diferenciación celular en la zona de transición de la raíz, ya que mutantes afectadas en la vía de señalización de citocinas, como son *ahk3*, *arr1* y *arr12* presentan meristemas más largos (Ioio *et al.* 2007). La vía a través de la cual se regula este proceso implica una proteína de la familia de genes inducibles por auxina/ácido indol 3 acético (Aux/IAA) denominada *SHORT HYPOCOTYL 2 (SHY2)* que actúa como inhibidor de respuesta a auxina. Las citocininas a través de la vía AHK3/ARR1 activan directamente la transcripción de SHY2, el cual regula negativamente la expresión de las proteínas transportadoras de eflujo de auxinas PIN, con lo que el transporte y distribución de auxinas es limitado permitiendo la diferenciación y por tanto reduciendo el tamaño del meristemo (Benjamins y Sheres 2008, Perilli *et al.* 2010). Además, las citocininas son reguladores negativos en la formación de raíces laterales al modificar la expresión de las proteínas PIN e impedir la formación del gradiente de auxinas necesario para la inducción de las raíces laterales (Laplaze *et al.* 2007). En la mutante *dhm1* se observa una mayor formación de raíces laterales, que podría ser debida a una menor producción de citocininas.

Sin embargo, la sola adición de cinetina no revierte el fenotipo de *dhm1*, ni el AIA provoca los efectos descritos para la *N*-isobutil decanamida, lo que indica que deben

existir un mayor número de reguladores del crecimiento vegetal afectados en esta mutante.

Entre los reguladores probados en este trabajo, no se observaron diferencias en el crecimiento de la raíz primaria de *dhm1* comparada con la respuesta de Col-0 a AIA, cinetina ni ABA (Figura 6). Esto sugiere que la percepción de los reguladores por la mutante es igual a la de la planta silvestre, por lo que los receptores a auxinas, citocininas y ABA son distintos al o los posibles receptores de alcaloides. En el caso del gen regulado por auxinas *DR5:uidA*, no se encontraron alteraciones en los sitios de expresión entre la planta transgénica y la mutante *dhm1* (Figura 8), lo que indica que las alcaloides no actúan a través de la vía de señalización mediada por auxinas, como lo habían reportado antes Ramírez-Chávez y colaboradores (2004).

Sin embargo, la mutante *dhm1* es hipersensible a la aplicación exógena de GA3 (Figura 7), lo que podría indicar que el receptor de GA3 es inducible por la alcaloide o bien que la alcaloide puede modificar la biosíntesis de GA3. Esta opción parece ser la más factible, ya que al agregar paclobutrazol, un inhibidor de la biosíntesis de giberelinas, se presenta una disminución en la formación de neoplasias en las hojas (datos no mostrados). Además, se ha determinado que las giberelinas son antagonicas a las citocininas (Veit 2009). Un efecto potencialmente mediado por las giberelinas es la proliferación celular, debido a que estas moléculas son reguladoras de la elongación celular (Ubeda-Tomás *et al.* 2008), y mantienen el crecimiento de la raíz a través del control del tamaño del meristemo por la inducción de la actividad mitótica (Ubeda-Tomás *et al.* 2009, Jaillais y Chory 2010). No obstante podría descartarse un efecto exclusivo de giberelinas, ya que la aplicación exógena de GA3, u otra giberelina, no induce la formación de neoplasias. Las giberelinas estimulan el crecimiento a través de la destrucción de las proteínas DELLA, las cuales son proteínas nucleares que restringen la proliferación celular y la expansión que controlan el crecimiento de las plantas (Achard *et al.* 2006, Jaillais y Chory 2010); además tienen un papel central como punto de cruce con otras señales, pudiendo mediar respuestas a GA, ABA, etileno, auxinas y estrés abiótico (Fu y Harberd 2003, Achard *et al.* 2006). Por lo que es probable que las proteínas DELLA también puedan estar implicadas en la regulación de las alcaloides.

Considerando los datos antes mencionados, *DHM1* parecería estar involucrado en distintos programas cruciales del desarrollo de la planta como son germinación, regulación de la arquitectura radicular y homeostasis del meristemo, a través de la vía citocínica y probablemente de las proteínas DELLA, coordinando la división y diferenciación celular, principalmente en tejidos jóvenes.

### 6.3.7. CONCLUSIONES

- La mutante *dhm1* esta afectada en un gen recesivo.
- *DHM1* coordina la división celular y diferenciación en tejidos jóvenes a través de la vía de citocininas y presuntamente interactuando con la vía de giberelinas.

### 6.3.8 REFERENCIAS

**Achard P, Cheng H, De Grauwe L, Decat J, Schoutteten H, Moritz T, Van Der Straeten D, Peng J, Harberd NP** (2006) Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science*. **311**: 91-94.

**Aloni R, Schwalm K, Langhans M, Ullrich I** (2003) Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *Planta*. **216**: 841-853.

**Beemster GTS, Fiorani F, Inze´ D** (2003) Cell cycle: the key to plant growth control? *Trends Plant. Sci.* **8**:154–158

**Benjamins R, Sheres B** (2008) Auxin: The Looping Star in Plant Development. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**:443–65.

**Beveridge CA, Mathesius U, Rose RJ, Gresshoff PM** (2007) Common regulatory themes in meristem development and whole-plant homeostasis. *Curr. Op. Plant Biol.* **10**: 44-51.

**Bishopp A, Mähönen AP, Helariutta Y** (2006) Signs of change hormone receptors that regulate plant development. *Development*. **133**:1857-1869.

**Blancaflor EB, Hou G, Chapman KD** (2003) Elevated levels of N-lauroylethanolamine, an endogenous constituent of desiccated seeds, disrupt normal root development in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Planta*. **217**:206-217.

**Brand U, Grünewald M, Hobe M, Simon R** (2002) Regulation of *CLV3* Expression by two homeobox genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **129**: 565-575.

**Campos-Cuevas JC, Pelagio-Flores R, Raya-González J, Méndez-Bravo A, Ortíz-Castro R, López-Bucio J.** (2008). Tissue culture of *Arabidopsis thaliana* explants reveals a stimulatory effect of alkamides on adventitious root formation and nitric oxide accumulation. *Plant Sci.* **174**: 165-173.

**Clark SE, Jacobsen SE, Levin JZ, Meyerowitz EM.** (1996) The *CLAVATA* and *SHOOT MERISTEMLESS* loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* **122**: 1567-1575.

**Clark SE, Williams RW, Meyerowitz EM** (1997) The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* **89**: 575–585.

**D'Agostino IB, Deruère J, Kieber JJ** (2000) Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiol.* **124**: 1706-1717.

**Fletcher JC, Brand U, Running MP, Simon R, Meyerowitz E M** (1999) Signaling of cell fate decisions by *CLAVATA3* in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science.* **283**: 1911–1914.

**Fosket DE** (1994). *Plant growth and development: a molecular approach* Academic Press, San Diego, California, USA.

**Frank M, Guivarc'h A, Krupkova E, Lorenz-Meyer I, Chriqui D, Schmölling T** (2002) *TUMOROUS SHOOT DEVELOPMENT (TSD)* genes are required for coordinated plant shoot development. *Plant J.* **29**:73-85.

**Fu X, Harberd NP** (2003) Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature.* **421**: 740-743.

**Gegas VC, Doonan JH** (2006) Expression cell cycle genes in shoot apical meristems. *Plant Mol. Biol.* **60**:947-961.

**Guo Y, Cai Z, Gan S** (2004) Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant Cell Environ* **27**: 521–549.

**Hardtke CS** (2006) Root development – branching into novel spheres. *Curr. Op. Plant Biol.* **9**:66-71.

**Hutchison CE, Kieber JJ** (2002) Cytokinin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell Supplement*: S47-S59.

**Ioio RD, Linhares FS, Scacchi E, Casamitjana-Martinez E, Heidstra R, Costantino P, Sabatini S** (2007) Cytokinins determine *Arabidopsis* root meristem size by controlling cell differentiation. *Curr. Biol.* **17**:678-682.

**Jaillais Y, Chory J** (2010) Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. *Nat. Estruc. Mol. Biol.* **17**: 642-645.

**Jun JH, Fiume E, Fletcher JC** (2007) The *CLE* family of plant polypeptide signaling molecules. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**: 743-755.

- Kepinski S** (2006) Integrating hormone signaling and patterning mechanisms in plant development. *Curr. Op. Plant Biol.* **9**: 28-34.
- Krupková E, Immerzeel P, Pauly M, Schmülling** (2007) The TUMOROUS SHOOT DEVELOPMENT 2 gene of *Arabidopsis* encoding a putative methyltransferase is required for cell adhesion and co-ordinated plant development. *Plant J.* **50**: 735–750.
- Kucera B, Cohn MA, Leubner-Metzger G** (2005) Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Sci. Res.* **15**: 281-307
- Laplaze L, Benkova E, Casimiro I, Maes L, Vanneste S, Swarup R, Weijers D, Calvo V, Parizot B, Herrera-Rodriguez MB** (2007) Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *Plant Cell.* **19**:3889-3900.
- Leasure CD, Fiume S, Fletcher JC** (2009) The Essentials gene EMB1611 maintains shoot apical meristem function during *Arabidopsis* development. *Plant J.* **57**:579-592.
- Leibfried A, To JPC, Busch W, Stehling S, Kehle A, Demar M, Kieber JJ, Lohmann JU** (2005) WUSCHEL control meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature.* **438**:1172-1175.
- Lindsay DL, Sawhney VK, Bonham-Smith PC** (2006) Cytokinin-induced changes in CLAVATA1 and WUSCHEL expresión temporally coincide with altered floral development in *Arabidopsis*. *Plant Sc.* **170**: 1111-1117.
- Ljung K, Bhalerao RP, Sandberg G** (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J.* **28**: 465-474.
- López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Pérez-Torres A, Ramírez-Pimentel JG, Sánchez-Calderon L, Herrera-Estrella L** (2005) *Root architecture in*: Turnbull, CGN. Plant architecture and its manipulation. Blackwell. 182-208.
- López-Bucio J, Millán-Godínez M, Méndez-Bravo A, Morquecho-Contreras A, Ramírez-Chávez E, Molina-Torres J, Pérez-Torres A, Higuchi M, Kakimoto T, Herrera-Estrella L** (2007) Cytokinin receptors are involved in alkamide regulation of root and shoot development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **145**: 1703-1713.
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.
- Newman KL, Fernandez AG, Barton MK** (2002) Regulation of axis determinacy by the *Arabidopsis* PINHEAD gene. *Plant Cell* **14**: 3029-3042.
- Noodén LD, Penney JP** (2001) Correlative controls of senescence and plant death in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *J Exp. Bot.* **52**:1151-1159.
- Ortiz-Castro R, Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, López-Bucio J** (2009) The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal Behav.* **4**: 1-12.
- Pelagio-Flores R** (2008) Aislamiento de mutantes de *Arabidopsis thaliana* afectadas en la respuesta a la *N*-isobutil decanamida. *Tesis de licenciatura. Facultad de Químico Farmacobiología UMSNH.* 45p.

- Perilli S, Moubayidin L, Sabatini S** (2010) The molecular basis of cytokinin function. *Curr. Op. Plant Biol.* **13**: 21-26.
- Ramírez-Chávez E, López-Bucio J, Herrera-Estrella L, Molina-Torres J** (2004) Alkamides isolated from plants promote growth and alter root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **134**:1058-1068
- Rojo E, Sharma VK, Kovaleva V, Raikher NV, Fletcher JC** (2002) CLV3 is localized to the extracellular space, where it activates the *Arabidopsis* CLAVATA stem cell signaling pathway. *Plant Cell.* **14**: 969-977.
- Sakakibara H** (2006) Cytokinins: Activity, biosynthesis and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 431-449.
- Sarkar A, Luijten M, Miyashima S, Lenhard M, Nakajima K, Scheres B, Heidstra R, Laux T** (2007) Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature.* **446**: 812-814.
- Shani E, Yanai O, Ori N** (2006) The role of hormones in shoot apical meristem function. *Curr. Op. Plant Biol.* **9**: 484-489.
- Stahl Y, Simon R** (2010) Plant primary meristems: shared functions and regulatory mechanisms. *Curr. Op. Plant Biol.* **13**: 53-58.
- Suzaki T, Yoshida A, Hirano HY** (2008) Functional diversification of CLAVATA3-related CLE proteins in meristem maintenance in rice. *Plant Cell.* **20**:2049-2058.
- Ubeda-Tomás S, Swarup R, Coates J, Swarup K, Laplaze L, Beemster, GTS, Hedden P, Bhalerao R, Bennett MJ** (2008) Root growth in *Arabidopsis* requires gibberellin/DELLA signaling in the endodermis. *Nat. Cell Biol.* **10**:625-628.
- Ubeda-Tomás S, Federici F, Casimiro I, Beemster GTS, Bhalerao R, Swaru R, Doerner P, Haseloff J, Bennett MJ** (2009) Gibberellin signaling in the endodermis controls *Arabidopsis* root meristem size. *Curr. Biol.* **19**: 1194-1199.
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ** (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell.* **9**: 1963-1971.
- Wang MC, O'Rourke EJ, Ruvkun G** (2008) Fat metabolism links germline stem cells and longevity in *C. elegans*. *Science* **322**: 957-960.
- Wang Y, Li J** (2008) Molecular basis of plant architecture. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 253-279.

## VII. DISCUSION GENERAL

Los lípidos son reconocidos como moléculas señalizadoras que tienen la capacidad de evocar profundas respuestas fisiológicas. El mismo compuesto puede afectar distintas respuestas, dependiendo del tipo celular sobre el que actúe, así como de la vía de señalización disparada en la célula blanco. Como ejemplos de lípidos implicados en vías de señalización intracelular tenemos al fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) que puede ser hidrolizado por la fosfolipasa C (PLC) a diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>). Ambos productos han sido identificados como segundos mensajeros que inducen la activación de la proteína cinasa C (PKC) y la liberación de Ca<sup>+2</sup> de los reservorios internos, respectivamente. Por su parte, el fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) es un lípido señal que modula el crecimiento celular y la proliferación. Las ceramidas y esfingosinas son lípidos con acción pro-apoptótica y antiproliferativa, sin embargo cuando son fosforiladas por cinasas de lípidos la esfingosina se transforma en esfingosina 1-fosfato, que promueve el crecimiento y proliferación celulares a través de receptores acoplados a proteínas G (Wymann y Scheiter 2008).

Los lípidos en plantas son parte estructural de las membranas, pero su papel va más allá al ser parte de los eventos de transducción de señales durante la morfogénesis de la planta, la maduración del embrión y la germinación de las semillas (Cowan 2006, Bach y Faure 2010). Así, por ejemplo, se conocen mutantes en enzimas necesarias para la  $\beta$ -oxidación, como son *acx1acx2*, *lacs6lacs7* y *kat2*, de las cuales los genes AXC codifican para acil-CoA oxidasa, los LACS para las sintasas acil-CoA de cadena larga y KAT2 es una triolasa primaria de  $\beta$ -oxidación. Estas mutantes no pueden movilizar lípidos durante la germinación y se expresan en hojas, particularmente en la senescencia, por lo que su actividad estaría implicada en la remoción de ácidos grasos, donde la germinación de las semillas y la senescencia comparten procesos metabólicos similares (Graham 2008, Yang y Ohlrogee 2009). Esta misma relación puede aplicarse en el caso de las mutantes afectadas en la percepción de la *N*-isobutil decanamida, especialmente en la *drr1*, en la que la

germinación y la senescencia se ven retrasadas, mientras que en *dhm1* el efecto solo es claro en la inducción de la germinación.

En este trabajo se caracterizaron dos mutantes, una resistente y otra hipersensible a la *N*-isobutil decanamida, lo que indica que la percepción de la alcanamida esta regulada por un mecanismo genético en *A. thaliana* y revela que la correcta percepción de las alcanamidas es necesaria para el desarrollo normal de la planta. En ambos casos, *drr1* y *dhm1* son mutaciones recesivas afectadas en un solo gen. Los fenotipos de estas mutantes son antagónicos en cuanto al crecimiento de la raíz primaria y la inducción de raíces laterales en respuesta a las alcanamidas.

Se ha propuesto que las alteraciones en la morfología de *A. thaliana* por la aplicación exógena de alcanamidas no están relacionadas con la vía de señalización de auxinas (Ramírez-Chávez *et al.*, 2004), y si con la de citocininas, ya que la *N*-isobutil decanamida activa la expresión del gen de respuesta primaria *ARR5*, lo cual indica que la vía de señalización de citocininas estaría involucrada en las alteraciones en la proliferación celular y diferenciación causadas por alcanamidas (López-Bucio *et al.*, 2007). Con la caracterización de estas mutantes realizada en el presente estudio, se comprueba inequívocamente que las citocininas están involucradas en la vía de señalización de las alcanamidas. Al tratarse de mutantes pleiotropicas, estos genes son reguladores de otros procesos probablemente a través de un sistema de señalización de dos componentes relacionado con los receptores de citocininas. En *Arabidopsis* la vía de señalización de las citocininas es regulada por un sistema de señalización de dos componentes que incluye los receptores CRE1 y AHK4 que son similares a His cinasas, proteínas que transfieren fósforo y contienen His (AHPs) y reguladores de genes de respuesta (ARRs) (Hutchison y Kieber, 2002). Cuando se realiza la transferencia del gen de respuesta primaria a citocininas *ARR5:uidA* a *dhm1*, existe una menor expresión de GUS (Figura 8), lo que indica claramente que la alcanamida altera la respuesta a citocininas en la planta y a través de esta modificación ejerce su efecto en el desarrollo de la planta. Por otra parte, se ha demostrado que las citocininas están relacionadas con la disminución de la senescencia a través de la activación de *ARR2* (*Arabidopsis response regulator 2*) vía la fosforilación por *AHK3* (*Arabidopsis histidine kinase 3*) (Kim *et al.*, 2006). Lo que sugiere que en la

longevidad de la mutante *drr1* podría estar involucrada la vía de señalización mediada por citocininas. Además, las citocininas son necesarias para la correcta organización celular en el meristemo apical, debido a que los genes TSD son necesarios para la organización estructural de la planta, a través de la regulación negativa de citocininas en el SAM (Frank *et al.*, 2002), en donde la proliferación celular es inducida por citocininas a través de la familia de genes *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR* (ARRs), los cuales interactúan directamente con el “loop” CLV/WUS, a través de la vía de señalización mediada por citocininas (Leibfried *et al.* 2005, Linsay *et al.* 2006).

Como las citocininas están involucradas en el control de las células madre tanto en la raíz como en el follaje, la diferenciación vascular, el crecimiento y la ramificación de raíz, tallo e inflorescencias, el balance de nutrientes, la senescencia de las hojas, la tolerancia al estrés y el desarrollo de la semilla (Shakakibara 2005, Müller y Sheen 2007), una gran parte de las respuestas de la planta a la alcanamida podrían estar determinadas por la modificación en la vía citocínica. Sin embargo, la adición de citocininas no provoca los efectos descritos para la *N*-isobutil decanamida, lo que sugiere que deben existir interacciones más complejas. Diferentes reguladores del crecimiento vegetal afectan la senescencia de las hojas, por ejemplo ABA la promueve, mientras que las auxinas, citocininas y giberelinas la disminuyen (Gan y Amasino 1997; Guiboileau *et al.* 2010). Otro ejemplo es la proliferación celular mediada por giberelinas que promueven y mantienen el incremento del crecimiento de la raíz controlando el tamaño del meristemo por la inducción de la actividad mitótica (Ubeda-Tomás *et al.* 2009) mediante la destrucción de las proteínas DELLA, las cuales tienen un papel central como punto de cruce de señales con otras reguladores (Achard *et al.* 2006). Dicho cruce de señales puede mediar respuestas a GA, ABA, etileno, auxinas y estrés abiótico (Fu y Harberd 2003, Achard *et al.* 2006). Por lo que es probable que las proteínas DELLA también puedan estar implicadas en la regulación de las alcanamidas.

Considerando que una de las características más evidentes del fenotipo de la mutante *drr1* es la longevidad extendida, se hace patente la necesidad de ahondar

sobre los procesos de envejecimiento y senescencia en los organismos como una forma de integrar la información generada a partir del aislamiento de esta mutante.

El envejecimiento, generalmente considerado el resultado del desgaste, es una etapa del desarrollo de los organismos regulado por rutas genéticas específicas, las cuales pueden ser modificadas dramáticamente por factores ambientales. Por ejemplo, en *Caenorhabditis elegans* se ha mostrado que mutaciones que reducen la actividad del receptor de insulina DAF-2 o en el fosfatidil inositol 3-cinasa (PI3K) AGE-1 provocan la extensión del ciclo de vida del gusano en más del 100% (Greer y Brunet, 2008). En este mismo organismo se ha reportado que las células madre de las células germinales (GSCs, por sus siglas en inglés) modulan activamente la hidrólisis de lípidos, los cuales a su vez regulan la longevidad del gusano. El arresto de las GSCs promueve la lipólisis sistémica al inducir una lipasa específica, la cual moviliza los lípidos generando un incremento en la longevidad. La expresión constitutiva de esta lipasa en mutantes *glp-1* y *glp-4* genera organismos delgados y longevos, en los que el incremento en el ciclo de vida es inducido por una disminución de la señalización en la vía insulínica. Cabe resaltar entonces que existe una interacción entre el metabolismo de los lípidos y la longevidad en *C. elegans* (Wang *et al.*, 2008). En el caso de las plantas, una de las primeras manifestaciones de la senescencia es la degradación de la membrana lipídica y un estudio del transcriptoma de hojas de *Arabidopsis* durante la senescencia reveló que muchas enzimas que degradan lípidos están sobre-expresadas, encontrando once lipasas/acil hidrolasas, seis fosfolipasas, dos lipoxigenasas y nueve enzimas de  $\beta$ -oxidación (Gou *et al.*, 2004). Dado que las alcámidas son compuestos lipídicos, podría considerarse que existe una enzima relacionada con el metabolismo de lípidos que juega un papel crucial dentro de la vía de señalización que está implicada en el incremento del ciclo de vida de la planta.

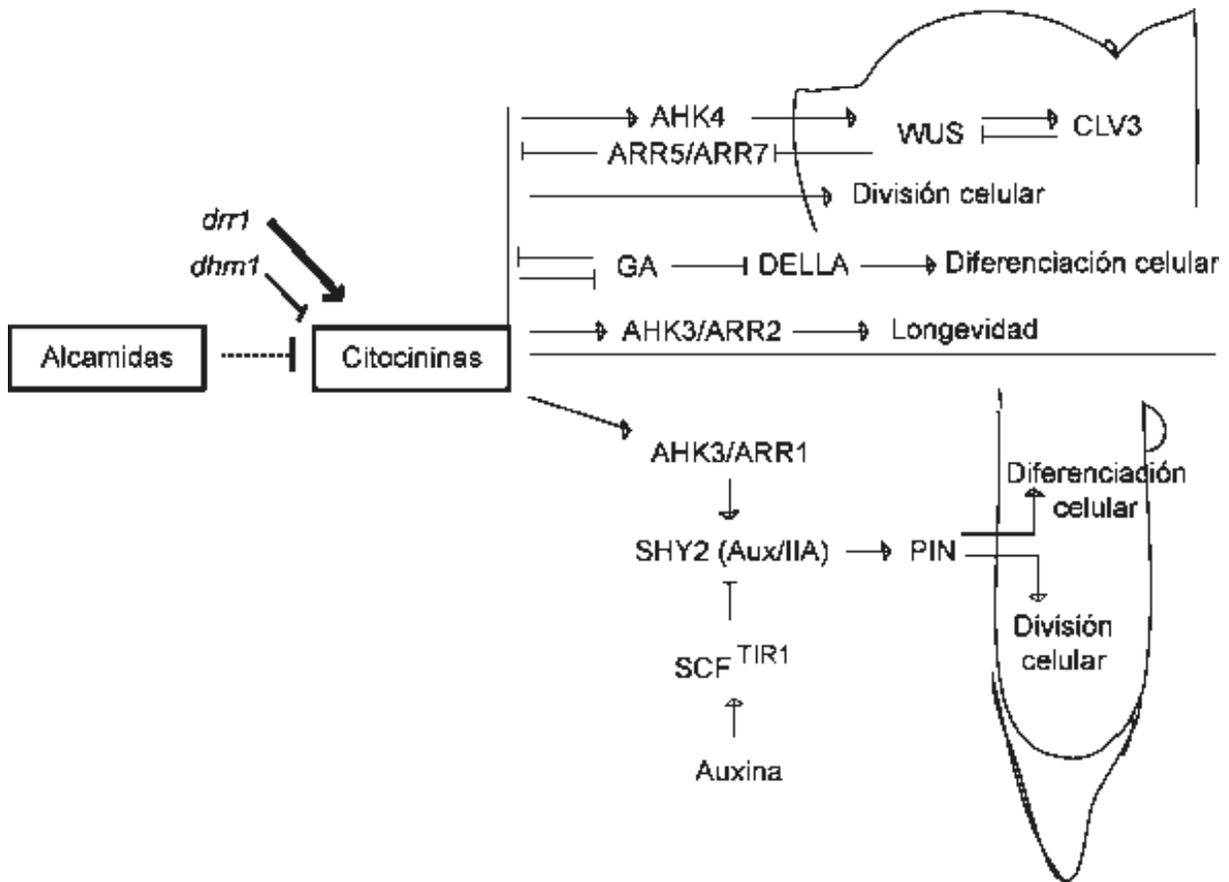
Además del prolongado ciclo de vida en la mutante *drr1*, esta presenta una mayor producción de biomasa. Esto es consistente con lo observado en otras mutantes con senescencia disminuida, como son *bell1*, *ms1-1* (macho y hembra estéril respectivamente), *clv3-2*, *clv2-4* (*clavata*), *det* (*de-etiolated*) y *dark-green*, las cuáles

tienen alteraciones en el crecimiento de la planta produciendo hojas y tallos mas grandes por una mayor actividad meristemática que prolonga la capacidad de la planta para generar estas estructuras, ya que al retrasar el inicio o disminuir la progresión de la senescencia se incrementa la biomasa de las plantas (Noodén y Penney, 2001; Yang y Ohlrogge, 2009).

Se ha observado que mutantes con mayor longevidad como *ore1*, *ore3* y *ore9* de *Arabidopsis* presentan una mayor tolerancia al estrés oxidativo, lo que sugiere que la regulación de la longevidad esta ligada a la tolerancia al estrés, lo cual ocurre en muchos organismos aerobios y esta evolutivamente conservado (Woo *et al.*, 2004). Por lo que se propone que la mutante *drr1* puede ser tolerante al estrés, lo cual daría una ventaja más a la identidad del gen *drr1* que potencialmente podría ser utilizado en el futuro con fines de mejoramiento genético de especies vegetales.

En otro contexto, los autoinductores bacterianos (AHLs) o moléculas de *quórum sensing*, muestran efectos similares al de las alcaloides sobre la arquitectura de la raíz. De hecho las plantas poseen la maquinaria enzimática necesaria para inactivar estas señales (Delalande *et al.* 2005, Ortiz-Castro 2008). Estos resultados indican que las AHLs podrían ejercer su efecto sobre *Arabidopsis* a través de la misma vía de señalización que la alcaloide. Lo anterior podría deberse a que estas moléculas están altamente conservadas entre distintos reinos o bien es resultado de la gran relación entre plantas y bacterias que llevó al desarrollo de moléculas similares para su comunicación.

Resumen, en la presente investigación se determinó que DRR1 esta involucrado en la fase de establecimiento de la plántula, desarrollo de raíz, así como en la regulación del ciclo de vida de la planta, mientras que *DHM1* esta implicado en la germinación, la regulación de la arquitectura radicular y la homeostasis del meristemo en tejidos jóvenes y ambos genes controlarían estas funciones a través de la vía de las citocininas y probablemente de las proteínas DELLA, coordinando la división y diferenciación celular.



**Figura 7. Modelo propuesto.** La alcamida podría inhibir a las citocininas, interactuando así con su vía de señalización.

## VIII. PERSPECTIVAS

- Determinar la identidad genética de DRR1 y DHM1.
- Realizar las cruzas entre la mutante *drr1* y las plantas transgénicas *DR5:uidA*, *ARR5:uidA* y *Clv3:uidA* para estudiar sus patrones de expresión.
- Determinar si las modificaciones en la germinación son dependientes de la alcalamida.
- Estudiar las características histológicas de las neoplasias producidas en la mutante *dhm1*.

## IX. REFERENCIAS COMPLEMENTARIAS

**Achard P, Genschik P** (2009) Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *J. Exp.Bot.* **60**:1085-1092

**Argyros RD, Mathews DE, Chiang YH, Palmer CM, Thibault DM, Etheridge N, Argyros DA, Mason MG, Kieber JJ, Schaller GE** (2008) Type B response regulators of *Arabidopsis* play key roles in cytokinin signaling and plant development. *Plant Cell* **20**:2102-2116

**Arroyo A, Bossi F, Filkestein RR, León P** (2003) Three genes that affect sugar sensing (*Abscisic Acid Insensitive 4*, *Abscisic Acid Insensitive 5* and *Constitutive Triple Response 1*) are differentially regulated by glucose in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **133**: 231-242.

**Awan FS, Khan IA, Khan AA, Schneider A, Altaf J, Ahmad R, Leister D** (2008) Screening of *Arabidopsis* mutants for functional genomic Studies. *Pak. J. Bot.* **40**: 2071-2080.

**Barton MK, Poething RS** (1993) Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild-type and shoot meristemless mutant. *Development* **119**: 823-831

**Bassel GW, Fung P, Chow TF, Foong JA, Provart NJ, Cutler SR** (2008) Elucidating the germination transcriptional program using small molecules. *Plant Physiol.* **147**: 143-155

**Báurle I, Laux T** (2005) Regulation of *wuschel* transcription in the stem cell niche of the *Arabidopsis* shoot meristem. *Plant Cell*, **17**: 2271–2280.

**Bechtold N, Ellis J, Pelletier G** (1993) In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life Sciences **316**: 1194-1199

**Bentsink L, Koornneef M** (2002) Seed dormancy and germination. *The Arabidopsis book*. doi: 10.1199/tab.0050

**Browse J** (2005) Jasmonate: an oxylipin signal with many roles in plants. *Vitam. Horm.* **72**: 431-456.

**Casimiro I, Marchant A, Bhalerao RP, Beeckman T, Dhooge S, Swarop R** (2001) Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* **13**:843-852.

**Casimiro J, Beeckman T, Graham N, Bhalerao R, Zhang H, Casero P, Sandberg G, Bennett MJ** (2003) Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends Plant Sci.* **8**: 165-171.

**Celenza JL, Grisafi PL, Fink GR** (1995) A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* **9**: 2131-2142.

**Chapman KD** (2004) Occurrence, metabolism and prospective functions of N-acylethanolamides in plants. *Prog. Lipids Res.* **43**:309-327.

**Clark SE, Running MP, Meyerowitz EM** (1995) CLAVATA3 is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as CLAVATA1.

*Development*. **21**: 2057-2067.

**Clark SE, Williams RW, Meyerowitz EM** (1997) The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* **89**: 575–585.

**Creelman RA, Mullet JE** (1995) Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 4114-4119.

**Cruz-Ramírez A, López-Bucio J, Ramírez-Pimentel G, Zurita-Silva A, Sánchez-Calderón L, González-Ortega E, Herrera-Estrella L.** (2004). The *xipoptl* mutant of *Arabidopsis* reveals a critical role for phospholipid metabolism in root system development and epidermal cell integrity. *Plant Cell*. **16**: 2020-2034.

**Cowan AK** (2006) Phospholipids as plant growth regulators. *Plant Growth Regul.* **48**:97-109.

**Delalande L, Faure D, Raffoux A, Uroz S, D'Angelo-Picard C, Elasri M, Carlier A, Berruyer R, Petit A, Williams P, Dessaux Y** (2005) *N*-hexanoyl-L-homoserine lactone, a mediator of bacterial quorum-sensing regulation, exhibits plant-dependence stability and may be inactivated by germinated *Lotus corniculatus* seedlings. *FEMS Microbiol Ecol.* **52**:13-20.

**De Smet I, Zhang H, Inzé D, Beeckman T** (2006) A novel role for abscisic acid emerges from underground. *Trends Plant Sc.* **11**: 434-439.

**Dewitte W, Scofield S, Alcasabas AA, Maughan SC, Menges M, Braun N, Collins C, Nieuwland J, Prinsen E, Sundaresan V, Murray JA** (2007) *Arabidopsis* CYCD3 D-type cyclins link cell proliferation and endocycles and are rate-limiting for cytokinin responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**:14537-14542.

**Dolan L, Duckett CM, Grierson C, Linstead P, Schneider K, Lawson E, Dean C, Poething S, Roberts K** (1994) Clonal relationships and cell patterning in the root epidermis of *Arabidopsis*. *Development*. **120**:2465-2474.

**Estelle MA, Somerville CR** (1986) The mutants of *Arabidopsis*. *TIG*. 89-92.

**Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G** (2006) Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.* **171**: 501-523.

**Fiers M, Ku KL, Liu CM** (2007) CLE peptide ligands and their roles in establishing meristems. *Curr. Op. Plant Biol.* **10**: 39-43.

**Finkelstein RR, Wang ML, Lynch TJ, Rao S, Goodman HM** (1998) The *Arabidopsis* abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA 2 domain protein. *Plant Cell*. **10**: 1043-1054.

**Finkelstein RR, Lynch TJ** (2000) The *Arabidopsis* abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* **12**: 599-609.

**Finkelstein RR, Gampala SSL, Rock CD** (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell*. S15-S45.

- Gan S, Amasino RM** (1997) Making sense of senescence: molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiol* **113**: 313–319
- Gegas VC, Doonan JH** (2006) Expression cell cycle genes in shoot apical meristems. *Plant Mol Biol.* **60**: 947-961.
- Gertsch J, Raduner S, Altman KH** (2006) New natural noncannabinoid ligands for cannabinoid type-2 (CB2) receptors. *J Recep Sig Transd.* **26**: 709-730.
- Giraudat J, Hauge BM, Valon C, Smalle J, Parcy F, Goodman HM** (1992) Isolation of the *Arabidopsis* ABI3 gene by positional cloning. *Plant Cell* **4**:1251-1261.
- Glazebrook J** (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopatol.* **43**: 205-227.
- Greer EL, Brunet A** (2008) Signaling networks in aging. *Cell Sci. Glac.* **121**: 407-412.
- Gou J, Strauss SH, Tsai CJ, Fang K, Chen Y, Jiang X, Busov VB** (2010) Gibberellins regulate lateral root formation in *Populus* through interactions with auxins and other hormones. *The Plant Cell.* **22**: 623-639.
- Graham I** (2008) Seed storage oil mobilization. *Annu.Rev.Plant Biol.* **59**: 115 - 142.
- Gray WM** (2004) Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS Biol* **2**: 1270-1273.
- Grieneisen VA, Xu J, Maree AFM, Blilou I, Hogeweg P, Scheres B** (2007) Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature.* **449**:1008–13.
- Guiboileau A, Sormani R, Meyer C, Masclaux-Daubresse C** (2010) Senescence and death of plant organs: Nutrient recycling and developmental regulation. *C. R. Biol.* **333**: 382-391.
- Haughn G, Schultz EA, Martinez-Zapater JM** (1995). The regulation of flowering in *Arabidopsis thaliana*: Meristems, morphogenesis and mutants. *Can. J. Bot.***73**: 959-981
- He Y, Fukushige H, Hildebrand DF, Gan S** (2005) Evidence supporting a role of jasmonic acid in *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant Physiol.* **128**: 876-88.
- Himanen K, Boucheron E, Vaneste S, de Almedida-Engler J, Inzé D, Beeckman T** (2002) Auxin mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell.* **14**:2339-2351.
- Ioio RD, Nakamura K, Moubayidin L, Perilli S, Taniguchi M, Morita MT, Aoyama T, Constantino P, Sabatini S** (2008) A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science.* **322**: 1380-1384.
- Ishida K, Yamashino T, Yokoyama A, Mizuno T** (2008) Three type-B response regulators, ARR1, ARR10 and ARR12, play essential but redundant roles in cytokinin signal transduction throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **49**:47-57.
- Jürgens G** (1995) Axis formation in plant embryogenesis: Cues and clues. *Cell.* **81**: 467-470.

- Kanbe K, Naganawa H, Okamura M, Sasaki T, Hamada M, Okami Y, Takeuchi T** (1993) Amidenin, a new plant growthregulating substance isolated from *Amycolatopsis* sp. *Biosc. Biotech. Biochem.* **57**:1261-1263.
- Katagiri T, Ishiyama K, Kato T, Tabata S, Kobayashi M, Shinozaki K** (2005) An important role of phosphatidic acid in ABA signaling during germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **43**:107-117.
- Kende H, Zeevaart JAD** (1997) The five “classical” plant hormones. *Plant Cell.* **9**:1197-1210.
- Kieber JJ** (2002) Cytokinins. *The Arabidopsis book*. doi: **10.1199/tab.0063**
- Kieffer M, Neve J, Kepinski S** (2010) Defining auxin response context in plant development. *Curr. Op. Plant Biol.* **13**:12-20.
- Kim HJ, Ryu H, Hong SH, Woo HR, Lim PO** (2006) Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**:814–19.
- Koornneef M, Hanhart, CJ, van der Veen JH** (1991) A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **229**: 57-66.
- Koornneef M, Bentsink L, Hilhorst H** (2002) Seed dormancy and germination. *Current opinion in plant biology* **5**: 33-36.
- Laskowski MJ, Williams ME, Nusbaum HC, Sussex I** (1995) Formation of lateral root meristem is a two stage process. *Development.* **121**: 3303-3310.
- Leyser OHM, Furner I** (1992) Characterisation of three shoot apical meristem mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Development.* **116**: 397-403
- López-Bucio J, Acevedo-Hernández G, Ramírez-Chávez E, Molina-Torres J, Herrera-Estrella L** (2006) Novel signals for plant development. *Curr. Op. Plant Biol.* **9**:523-529.
- Malamy JF, Benfey PN** (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**:33-44.
- Maxwell BB, Kieber JJ** (2004) Cytokinin signal transduction. In: Davies PJ. *Plant Hormones. Biosynthesis, signal transduction, action!* Kluwer Academic Publishers. 321-341.
- Meyerowitz EM** (1989) *Arabidopsis*, a useful weed. *Cell.* **56**: 263-269.
- Meyerowitz EM** (1994) Plant developmental biology: green genes for the 21st century. *BioEssays.* **16**: 621-625.
- Miller CO, Skoog F, Von Saltza MH, Strong F** (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **77**:1392.
- Mosblech A, Feussner I, Heilmann I** (2010) Oxilipin signaling and plant growth. in: Munnik T. Lipid signaling in plants. Springer 277-291.

- Motes CM, Pechter P, Min-Yoo C, Yuh-Shuh W, Chapman KD, Blancaflor EB** (2005) Differential effects of two phospholipase D inhibitors, 1-butanol and *N*-acylethanolamine, on *in vivo* cytoskeletal organization and *Arabidopsis* seedling growth. *Protoplasma*. **226**:109-123.
- Müller K, Tintelnot S, Leubner-Metzger** (2006) Endosperm-limited brassicaceae seed germination: abscisic acid inhibits embryo-induced endosperm weakening of *Lepidium sativum* (cress) and endosperm rupture of cress and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. **47**: 864-877.
- Müller B, Sheen J** (2007) Advances in cytokinin signaling. *Science*. **318**: 68-69.
- Nambara E, Marion-Poll A** (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**:165-185.
- Nagpal P, Walker LM, Young JC, Sonawala A, Timpte C, Estelle M, Reed JW** (2000) *AXR2* encodes a member of the Aux/IAA protein family. *Plant Physiol*. **123**:563-573.
- Nishimura C, Ohashi Y, Sato S, Kato T, Tabata S, Ueguchi C** (2004) Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **16**:1365-1377.
- Olszewski N, Sun T, Gubler F** (2002) Gibberellin signaling: Biosynthesis, catabolism and response pathways. *Plant Cell*. S61-S80.
- Ortiz-Castro R, Martínez-Trujillo M, López-Bucio J** (2008) *N*-acyl-L-homoserine lactones: a class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ*. **31**:1497-1509.
- Ortiz-Castro R** (2008) Regulación del desarrollo post-embrionario de la raíz de *Arabidopsis thaliana* por *N*-acil-L-homoserina lactonas, una clase de compuestos moduladores de la proliferación celular en bacterias. *Tesis de maestría, UMSNH*. 140p.
- Rashotte A, Brady SR, Reed RC, Ante SJ, Muday GM** (2000) Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. **122**:481-490.
- Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacquard A, Murray JA** (1999) Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science*. **283**:1541-1544.
- Schiefelbein J.W., Masucci J.D., Wang H** (1997) Building a root: the control of patterning and morphogenesis during root development. *Plant Cell*. **9**:1089-1098.
- Söderman EM, Brocard IM, Lynch TJ, Finkelstein RR** (2000) Regulation and function of the *Arabidopsis ABA-insensitive4* gene in seed and abscisic acid response signaling Networks. *Plant Physiol*. **124**:1752-1765.
- Staswick PE, Su W, Howell SH** (1992) Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **89**: 6837-6840.

- Stewart RN, Dermen H** (1975). Flexibility in ontogeny as shown by the contribution of the shoot apical layers to leaves of periclinal chimeras. *Am. J. Bot.* **62**: 935-947.
- Strasburger** (2004) *Tratado de botánica*. 35a Ed. Omega. España. 654 p.
- Taiz L, Zeiger E** (1998) *Plant physiology* 2<sup>nd</sup> ed. Sinauer Associates Inc. USA. 785 p.
- Teale WD, Paponov IA, Palme K** (2006) Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat Rev. Mol Cell Biol.* **7**: 847-859.
- Truman WM, Bennett MH, Turnbull CGN, Grant MR** (2010) Arabidopsis auxin mutants are compromised in systemic acquired resistance and exhibit aberrant accumulation of various indolic compounds. *Plant Physiol.* **152**: 1562-1573.
- Veit B** (2009) Hormone mediated regulation of the shoot apical meristem. *Plant Mol. Biol.* **69**: 397-408.
- Wang X** (2004) Lipid signaling. *Curr. Op. Plant Biol.* **7**:329-336.
- Wang YS, Shrestha R, Kilaru A, Wiant W, Venables BJ, Chapman KD, Blancaflor EB** (2006) Manipulation of *Arabidopsis* fatty acid amide hydrolase expression modifies plant growth and sensitivity to N-aciletanolamines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **32**: 12197-12202
- Wasilewska A, Vlad F, Sririchandra C, Redko Y, Jammes F, Valon C, Frey NF, Leung J** (2008) An update on abscisic acid signaling in plants and more... *Mol. Plant* **1**:198-217.)
- Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Van Onckelen H and Schmulling T** (2003) Cytokinin deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell.* **15**:2532-2550
- Weyers JDB, Paterson NW** (2001) Plant hormones and the control of physiological processes. *New Phytol.* **152**: 375-407
- Wilson AK, Pickett FB, Turner JC, Estelle M** (1990) A dominant mutation to *Arabidopsis* confers resistance to auxin, ethylene and abscisic acid. *Mol. Gen. Genet.* **222**:377-383
- Woo HR, Kim JH, Nam HG, Lim PO** (2004) The delayed leaf senescence mutants of *Arabidopsis*, *ore1*, *ore3*, and *ore9* are tolerant to oxidative stress. *Plant Cell Physiol.* **45**: 923–932
- Yamaguchi S** (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 225-251
- Yang Z, Ohlrogge** (2009) Turnover of fatty acids during natural senescence of *Arabidopsis*, *Brachypodium*, and switchgrass and in *Arabidopsis*  $\beta$ -oxidation mutants. *Plant Physiol.* **150**: 1981-1989.