



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

**LABORATORIO DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO
VEGETAL**

**“Caracterización de la respuesta a serotonina mediada
por cinasas MAP y la fosfatasa MKP1 en *Arabidopsis
thaliana*”**

TESIS

que presenta

BIOL. KAREN MONSERRAT GARCÍA VALLE

para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Experimental

Director: D.C. JOSÉ LÓPEZ BUCIO

Morelia, Michoacán, marzo de 2022



Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección del D.C. José López Bucio, con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (número de becario 765606).

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Jaime y Marisela, por su amor, su apoyo, su incansable trabajo y por recordarme constantemente un ejemplo de lo que yo aspiro a lograr.

A mi hermana Marisela, por ser mi compañía todo este tiempo, su cariño, sus cuidados, su disponibilidad de escuchar y su comprensión ante cualquier cosa.

A mis hermanos, Anette y Jaime, por su cariño, su compañía, sus visitas que siempre me alegraban y me hacían añorar por la siguiente.

A mi asesor, el D.C. José López Bucio, por todas las facilidades otorgadas en su equipo de trabajo, así como por la dirección y acertados consejos a este proyecto.

Al D. C. León Francisco Ruíz Herrera, por la guía y el apoyo que le dio a este trabajo.

A mis sinodales, los D.C. Ernesto García Pineda, Homero Reyes de la Cruz, Ramón Pelagio Flores y Jesús Salvador López Bucio, por sus valiosas observaciones y consejos aportados a la mejora del presente trabajo.

A mis maestros y mi tutora, por transmitirme conocimientos indispensables para mi formación académica en esta maestría, y a esta última, por la orientación para superar los retos que la maestría representó, especialmente mentales.

A mis compañeros de laboratorio, por brindarme su compañía a lo largo de esta estancia, así como su ayuda y consejos cuando lo necesitaba. Especialmente a Gustavo, por los comentarios y revisiones a esta tesis.

A mis compañeros de generación, Katia, Paty, Ashanty, Birmania, David y Carlos, por los momentos tan gratos que compartimos y por la amistad desinteresada brindada en este corto tiempo.

A Arturo. Finalmente, y con especial reconocimiento, por ser mi primer lugar de apoyo y por ser mi hogar siempre.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	5
2.1.1 Sistema radicular.....	6
2.2 Reguladores del crecimiento vegetal	9
2.3 Ácido jasmónico.....	10
2.3.1 Biosíntesis, transporte y señalización del AJ	11
2.4 Neurotransmisores como reguladores del crecimiento	15
2.5 Serotonina	15
2.5.1 Descubrimiento y distribución de la serotonina	16
2.5.2 Biosíntesis de la serotonina	17
2.5.3 Regulación de la fotosíntesis y ritmos circadianos	19
2.5.4 Efectos sobre el crecimiento vegetal.....	19
2.5.5 Modulación de la arquitectura radicular y relación con la vía auxínica..	20
2.5.6 Papel de la serotonina en la regulación de hormonas de defensa	22
2.6 Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)	23
2.6.1 Mecanismos antioxidantes	26
2.6.2 Función como molécula señal y efectos sobre el desarrollo vegetal	27
2.6.3 ERO en la señalización de serotonina	29
2.7 Proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK)	32
2.7.1 Procesos vegetales regulados por MAPK	34
2.8 Regulación negativa de la vía MAPK.....	34

2.8.1 El papel de MKP1.....	35
2.8.2 Regulación de ERO por MAPK y fosfatasa.....	36
3. JUSTIFICACIÓN	40
4. HIPÓTESIS	40
5. OBJETIVOS	40
5.1 Objetivo general.....	40
5.2 Objetivos particulares	40
6. METODOLOGÍA.....	41
6.1 Material biológico y condiciones de crecimiento	41
6.2 Obtención de cruza.....	41
6.3 Análisis histoquímico de la actividad GUS.....	42
6.4 Análisis del desarrollo vegetal	43
6.5 Detección de especies reactivas de oxígeno.....	43
6.6 Tinción con yoduro de propidio y microscopía confocal	44
6.7 Análisis estadístico	44
7. RESULTADOS	45
7.1 La serotonina afecta el crecimiento de la raíz de <i>Arabidopsis</i> a través de la fosfatasa MKP1	45
7.2 MPK6 está involucrada en la respuesta a serotonina, mediada por MKP1 .	46
7.3 La serotonina regula procesos celulares de división, elongación y diferenciación, de manera dependiente de MKP1	50
7.4 La respuesta a etileno en la raíz es independiente a MKP1	56
7.5 MKP1 es un mediador de la respuesta al ácido jasmónico en la raíz	57
7.6 La serotonina induce la actividad de los represores JAZ1 y JAZ10, a través de MKP1	58

7.7 La serotonina actúa de manera independiente de LOX2 en plantas Col-0 y <i>mkp1</i>	62
7.8 MKP1 orchestra la acumulación de ERO, en respuesta a serotonina	63
7.9 MKP1 regula la producción de H ₂ O ₂ en la punta de la raíz	67
8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	71
9. LITERATURA CITADA.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología y ciclo de vida de <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
Figura 2. Arquitectura radicular y estructura celular de la raíz.	9
Figura 3. Ruta metabólica del ácido jasmónico	14
Figura 4. Biosíntesis de la serotonina y sus derivados.....	18
Figura 5. Efectos de la serotonina sobre la raíz	22
Figura 6. Producción de ERO en plantas y sus mecanismos de eliminación	25
Figura 7. Modelo de la regulación en el tamaño del meristemo, a través de ERO y UPB1.....	28
Figura 8. La serotonina disminuye el crecimiento de la raíz mediante la señalización de ácido jasmónico y el incremento de ERO.....	31
Figura 9. Vía de señalización de MAPK	33
Figura 10. MKP1 regula la producción de ERO ante respuestas inmunes	38
Figura 11. Efecto de la serotonina sobre el crecimiento de plantas Col-0 y mutantes <i>mkp1</i>	46
Figura 12. Efecto de la serotonina en plantas Col-0 y mutantes <i>mpk6</i>	47
Figura 13. Efecto de la serotonina sobre plantas Col-0 y la doble mutante <i>mkp1mpk6</i>	48
Figura 14. Comparación del efecto de la serotonina sobre la mutante <i>mkp1</i> y la línea sobre expresora 35S:MPK6.....	50
Figura 15. Efecto de la serotonina sobre la división, diferenciación y expresión de CycB1.....	52
Figura 16. Efecto de la serotonina sobre la zona de elongación celular.....	55
Figura 17. Efecto del ACC sobre el crecimiento de plantas Col-0 y <i>mkp1</i>	56
Figura 18. Efecto del ácido jasmónico sobre el crecimiento de plantas Col-0 y <i>mkp1</i>	57
Figura 19. Comparación de la expresión de <i>JAZ1::JAZ1:GFP</i> en respuesta a serotonina y ácido jasmónico en plantas Col-0 y <i>mkp1</i>	60
Figura 20. Comparación de la expresión de <i>JAZ10::JAZ10:GFP</i> en respuesta a serotonina en plantas Col-0 y <i>mkp1</i>	61

Figura 21. Comparación de la expresión de <i>LOX2::GUS</i> en respuesta a serotonina y ácido jasmónico en plantas Col-0 y <i>mkp1</i>	62
Figura 22. Efecto de la serotonina sobre la acumulación de ERO totales en plantas Col-0 y <i>mkp1</i>	64
Figura 23. Acumulación de ERO totales en Col-0, <i>mkp1</i> y <i>35S:MPK6</i> en respuesta a diferentes concentraciones de serotonina.....	66
Figura 24. Expresión de <i>35S:HyPer::YFP</i> en respuesta a serotonina en los fondos genéticos Col-0 y <i>mkp1</i>	68
Figura 25. Efecto del resveratrol sobre la producción de ERO en plantas Col-0 y <i>mkp1</i> tratadas con serotonina	70
Figura 26. Modelo propuesto de la participación de MKP1 en la respuesta a serotonina, a través de la señalización de ERO y ácido jasmónico	75

RESUMEN

La serotonina (5-hidroxitriptamina) es un conocido neurotransmisor en mamíferos que también se encuentra ampliamente distribuido en las plantas. Es un compuesto derivado del triptófano, con similitud estructural a las auxinas, que influencia el crecimiento y desarrollo de la raíz actuando a través de la regulación de la vía de las auxinas y la señalización por hormonas de defensa, como el ácido jasmónico (AJ) y el etileno, mismos que activan una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) para regular el desarrollo de la raíz primaria. Las ERO son moléculas altamente reactivas, derivadas de las reacciones metabólicas de la célula, que en cantidades moderadas funcionan como moléculas señal y manifiestan una distribución diferencial en las zonas de crecimiento de la raíz.

Los programas de crecimiento y defensa de las plantas, así como la inducción de ERO, son procesos mediados por Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos (o MAPK, por sus siglas en inglés), las cuales a su vez son dependientes de fosfatasas que funcionan como reguladores negativos. En este trabajo se analizó el papel de la fosfatasa MKP1 en la respuesta de la raíz de *Arabidopsis thaliana* ante tratamientos con serotonina, usando plantas mutantes deficientes en el gen *MKP1*. La serotonina provocó la disminución en la tasa de división celular en la raíz, modificó la estructura del meristemo y adelantó el proceso de diferenciación celular a través de MKP1. Además, se observó la inducción de la expresión de genes cuyos productos proteínicos están involucrados en la vía de señalización del AJ, específicamente de los represores JAZ1 y JAZ10, lo cual correlacionó con una mayor producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) de manera dependiente de MKP1. El estudio de la MAP cinasa MPK6, que forma un módulo de señalización con MKP1 ampliamente caracterizado, indica que la cinasa actúa como regulador negativo de la respuesta a serotonina. Nuestros datos ayudan a esclarecer la relación entre la serotonina y la vía de señalización del AJ y revelan la importancia que tiene la vía MAPK en el desarrollo de la raíz a través de la modulación de la producción de ERO.

Palabras clave: Desarrollo radicular, serotonina, MAPK, fosfatasas, fitohormonas.

ABSTRACT

Serotonin (5-hydroxytryptamine) is a well-known neurotransmitter in mammals that is also found in the plant kingdom. It is a tryptophan-derived compound that belongs to the indole-amine group, but with structural similarity with auxins. Serotonin can influence root growth and defense hormone through jasmonic acid (JA) and ethylene signaling, which orchestrate the production of high amounts of reactive oxygen species (ROS), which are highly reactive molecules regulating a plethora of physiological and developmental responses. One of these ROS-regulated processes is root development, which is molded according to ROS distribution within growth zones.

Both growth and defense programs, as well as ROS induction, are mediated by Mitogen-Activated Protein Kinases cascades (MAPK) that in turn, depend on MAPK phosphatases as negative regulators. In this work, we aimed at elucidating the possible role of MKP1 phosphatase in mediating serotonin response in *Arabidopsis thaliana*, by using *mkp1* mutants. We found that serotonin diminished cell division rate within the primary root, altered meristem structure, and triggered cell differentiation, all through MPK1. Furthermore, serotonin activates the expression of genes involved in JA signaling, particularly the JAZ1 and JAZ10 repressors, which unchained the production of H₂O₂ via MKP1. We also unveiled MPK6 kinase, a widely investigated protein that is commonly phosphorylated by MKP1, as a negative regulator in serotonin response. These data help to clarify the relationship between serotonin and JA signaling and reveal the importance of the MAPK pathway in root development through ROS production.

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo del sistema radicular es altamente sensible a las condiciones cambiantes del ambiente; y posee una alta capacidad de modificar su arquitectura (Hutchings y de Kroon, 1994). Los procesos que definen dicha plasticidad fenotípica son: 1) la división celular en el meristemo, responsable del crecimiento indeterminado contribuyendo con la producción de nuevas células; 2) la formación de raíces laterales, que incrementan la capacidad exploratoria; y 3) la formación de pelos radiculares, los cuales extienden la superficie de absorción (López-Bucio *et al.*, 2003).

El desarrollo radicular, así como la respuesta fisiológica hacia los diversos estímulos del ambiente, están mediados por sustancias conocidas como fitohormonas o reguladores del crecimiento, a los que se han sumado recientemente un número amplio de metabolitos con actividad biológica entre los que se encuentra la serotonina, un compuesto que funciona como neurotransmisor en mamíferos (Shan *et al.*, 2012; Erland *et al.*, 2019).

La serotonina es una indolamina del sistema nervioso que modula el sueño, el estado de ánimo y el apetito en animales, en tanto que en las plantas cumple funciones importantes en la división y diferenciación celular, así como en la reproducción (Erland *et al.*, 2019). Su aplicación reprime el crecimiento de la raíz primaria (RP), debido en parte a un efecto antagónico sobre la actividad de las auxinas, un grupo fundamental de hormonas del crecimiento (Pelagio-Flores *et al.*, 2011).

La serotonina también influye en la señalización de hormonas involucradas en defensa, como el ácido jasmónico (AJ) y el etileno (Pelagio-Flores *et al.*, 2016). El AJ se produce en respuesta a la herbivoría y lesiones en los órganos, y el etileno es un gas que se libera durante la maduración de frutos y funciona como detonante para la senescencia y la adaptación ante el estrés abiótico. La conexión entre el AJ y el etileno y la respuesta a serotonina implica una mayor acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Mukherjee, 2018).

En diversos estudios se ha evidenciado que la producción de ERO implica una vía de señalización de las Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos (MAPK) y sus reguladores negativos, las MAPK fosfatasas. En ausencia de la fosfatasa MKP1, existe una mayor producción de ERO en respuesta al agobio ambiental (Ulm *et al.*, 2002; Escudero *et al.*, 2019). De hecho, el módulo MPK6-MKP1 también regula la respuesta de la raíz a algunos aminoácidos, como el glutamato y el triptófano, este último siendo el precursor de la serotonina (López-Bucio *et al.*, 2018; Ravelo-Ortega *et al.*, 2021). En este trabajo, indagamos si la vía de MAPK participa en la respuesta de la raíz a serotonina, y si alguno de estos elementos está también involucrado en la señalización de AJ y ERO.

2. ANTECEDENTES

2.1 *Arabidopsis thaliana*

Las plantas son organismos sésiles con una gran plasticidad fenotípica que les permite adaptarse y hacer frente a las condiciones ambientales en las que se desarrollan. Para estudiar estos procesos biológicos, ha sido indispensable el uso de organismos modelo como *A. thaliana*.

A raíz de los estudios de Laibach a inicios del siglo XX en Europa y del mapeo genético de esta planta a principios de 1980, *A. thaliana* se convirtió en un modelo biológico importante para el estudio de los sistemas vegetales debido a que tiene un tamaño relativamente pequeño que la hace fácil de cultivar y manipular en condiciones de laboratorio, un ciclo de vida corto desde la germinación de la semilla hasta la producción de frutos (silicuas) de aproximadamente 6 semanas (**Fig. 1**), una producción de semillas abundante, así como un genoma pequeño y completamente secuenciado que consta de 5 cromosomas (125 Mb) con alrededor de 30, 000 genes (Laibach, 1907; Meinke *et al.* 1998). La secuenciación del genoma ha permitido que a través de estrategias de mutagénesis dirigida se hayan conformado bancos de germoplasma que han constituido una buena herramienta para análisis genéticos y moleculares detallados (Leonelli, 2007).

La planta adulta alcanza un tamaño de hasta 40 cm de altura (dependiendo de las condiciones ambientales), y está conformada por hojas basales que forman una roseta de alrededor de 5 cm de diámetro, de donde emerge un tallo con hojas caulinares más pequeñas e inflorescencias en el ápice. Las hojas están cubiertas en la superficie por pequeños pelos unicelulares llamados tricomas, los cuales son buenos modelos de estudio sobre la morfogénesis y diferenciación celular. Las flores son blancas, de aproximadamente 3 mm de largo en su estado maduro; constan de cuatro sépalos y cuatro pétalos, 6 estambres y un ovario bicarpelar en el centro; normalmente las flores se autopolinizan, pero también son fáciles de fecundar artificialmente en condiciones de laboratorio. Después de la fertilización,

el ovario comienza a elongarse hasta madurar en un fruto llamado silicua, que puede contener entre 30 y 60 semillas (Meyerowitz 1987).

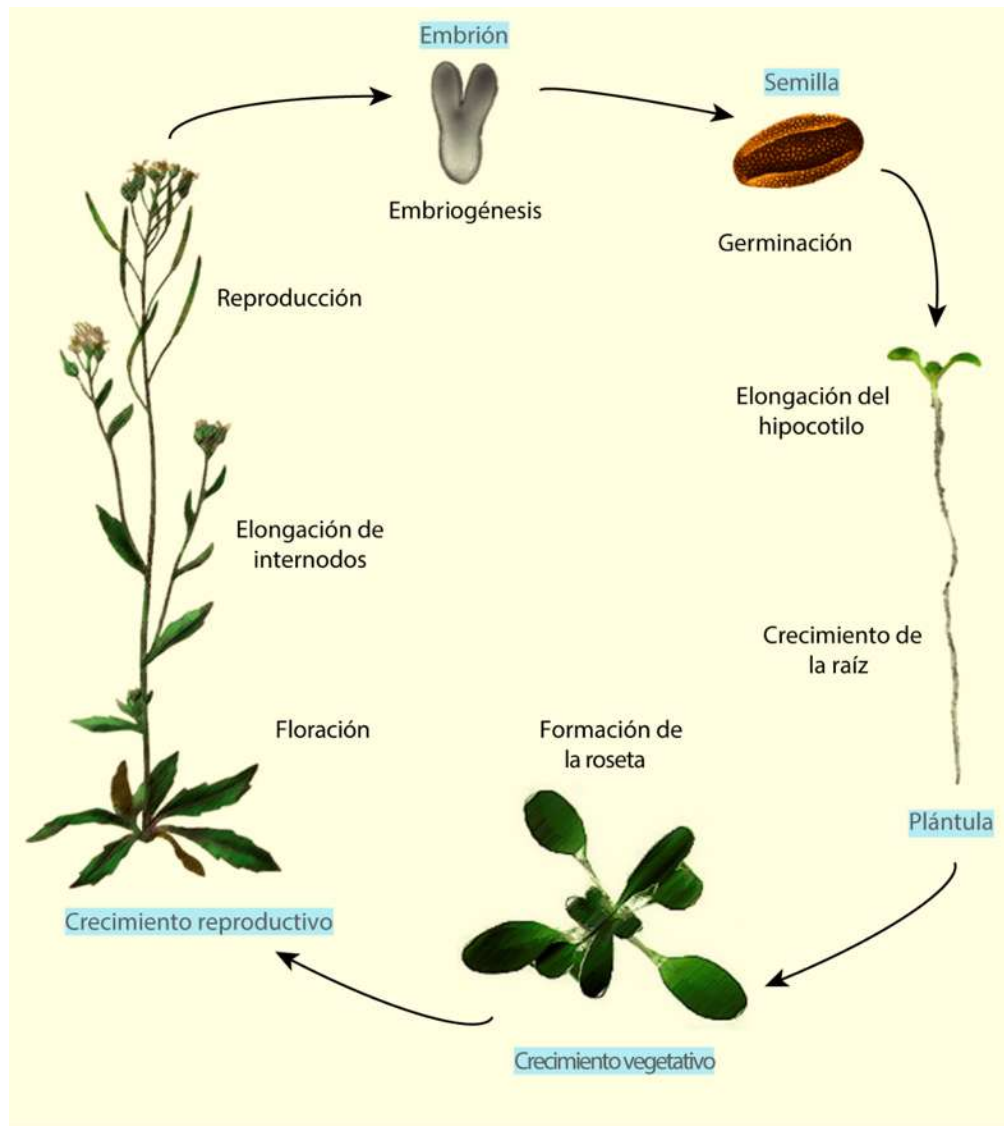


Figura 1. Morfología y ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*. Las fases del ciclo de vida de *A. thaliana* se resaltan en color azul, y se presentan imágenes del fenotipo en cada etapa según Depuydt y Hardtke (2011).

2.1.1 Sistema radicular

El sistema radicular de las plantas cumple las funciones de sostén, de captación de agua y nutrientes y sus exudados contribuyen en la conformación de los microbiomas que acompañan a la planta a lo largo de todo su ciclo de vida. Su plasticidad le permite reaccionar ante los diferentes estímulos como la salinidad, el

pH, la humedad, o los tropismos, que influyen en la dirección de crecimiento (López-Bucio *et al.* 2003).

En *A. thaliana*, la organización de la raíz es relativamente simple, ya que está conformada por una raíz primaria (RP), raíces laterales (RL) y pelos radiculares (PR) (**Fig. 2A**). La RP tiene un crecimiento indeterminado y se extiende verticalmente siguiendo el estímulo de la gravedad (gravitropismo); por su parte, las RL son aquellas que emergen de la RP e incrementan el área que abarca la raíz en la rizósfera, así también su capacidad exploratoria para encontrar los nutrientes que la planta necesita. La principal diferencia entre la RP y las RL es su sensibilidad ante los efectos de la gravedad, es decir, la RP es generalmente más gravitrópica y es la encargada de establecer a qué profundidad llegarán a desarrollarse las RL (Rellán-Álvarez *et al.*, 2016). Los PR cubren la superficie de la raíz, con excepción de los meristemas, encargados de aumentar la superficie de absorción de la raíz y de ser un medio de interacción con la rizósfera y los microorganismos presentes en ella (Ishida *et al.*, 2008).

Otro componente de la arquitectura radicular son las raíces adventicias, que junto con las RL se encargan del forrajeo de nutrientes y, al igual que estas, se desarrollan de manera post-embrionaria (Martínez de la Cruz *et al.*, 2015). Sin embargo, mientras las RL se desarrollan a partir de la raíz, las raíces adventicias nacen del hipocotilo (en el caso de *Arabidopsis*) o algún otro órgano aéreo como tallos y ramas. Las raíces adventicias pueden proliferar en condiciones de estrés para la planta (Geiss *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009). Las hormonas (especialmente auxinas), los azúcares, la temperatura, las sales minerales, así como las condiciones de luz son factores que pueden inducir a un grupo de células a diferenciarse formando raíces adventicias (Takahashi *et al.*, 2003).

El crecimiento indeterminado de la raíz es una consecuencia de la actividad constante del meristemo apical, promovido por el centro quiescente (CQ), el cual está formado por un pequeño grupo de células con una baja actividad mitótica, encargadas de mantener el estado indiferenciado del meristemo. Cuando las células iniciales se dividen generan dos células hijas; la que se encuentra cercana

al CQ mantiene su estado indiferenciado, mientras que la otra célula continúa dividiéndose indeterminadamente antes de dejar el meristemo y comenzar a elongarse (Scheres, 2007). Existen cuatro zonas primordiales: la primera y la más próxima al ápice, con una alta actividad mitótica, es la zona meristemática (ZM); conforme las células van bajando su tasa de división y comienzan a aumentar de tamaño, entran en la zona de transición (ZT), alcanzando su tamaño final en la zona de elongación (ZE). Posteriormente, se encuentra la zona de diferenciación (ZD), en donde las células terminan de madurar y entran a un estado diferenciado, posicionándose en las distintas capas celulares (**Fig. 2B**) (Dolan *et al.*, 1993).

Las capas celulares que conforman a la raíz están dispuestas de manera radial y nacen a partir del nicho de células iniciales. De afuera hacia dentro encontramos diversas capas celulares como se ilustra en la **Fig. 2C**.

La epidermis es la capa exterior de la raíz y por lo tanto es la que está en contacto directo con la rizósfera, contiene atricoblastos y tricoblastos, siendo estas últimas las que darán lugar a los PR. Mas adentro se encuentra el córtex y posteriormente la endodermis, la cual juega un papel importante como barrera hidrofóbica que regula el paso de agua y nutrientes. Después de la endodermis, se encuentra el periciclo, encargado del mantenimiento de la actividad meristemática y la formación de las RL. En el centro encontramos los haces vasculares, xilema y floema, encargados de transportar y distribuir agua y nutrientes, respectivamente, a través de toda la planta. En el ápice de la raíz está presente la cofia, la cual está en un proceso de renovación continua para proteger a la raíz de la fricción, conforme esta se va adentrando en el suelo. Junto con la cofia se encuentra también la columnela, encargada de direccionar el crecimiento de la raíz en favor de la gravedad, mediante depósitos de amiloplastos presentes en ella (Petricka *et al.*, 2012).

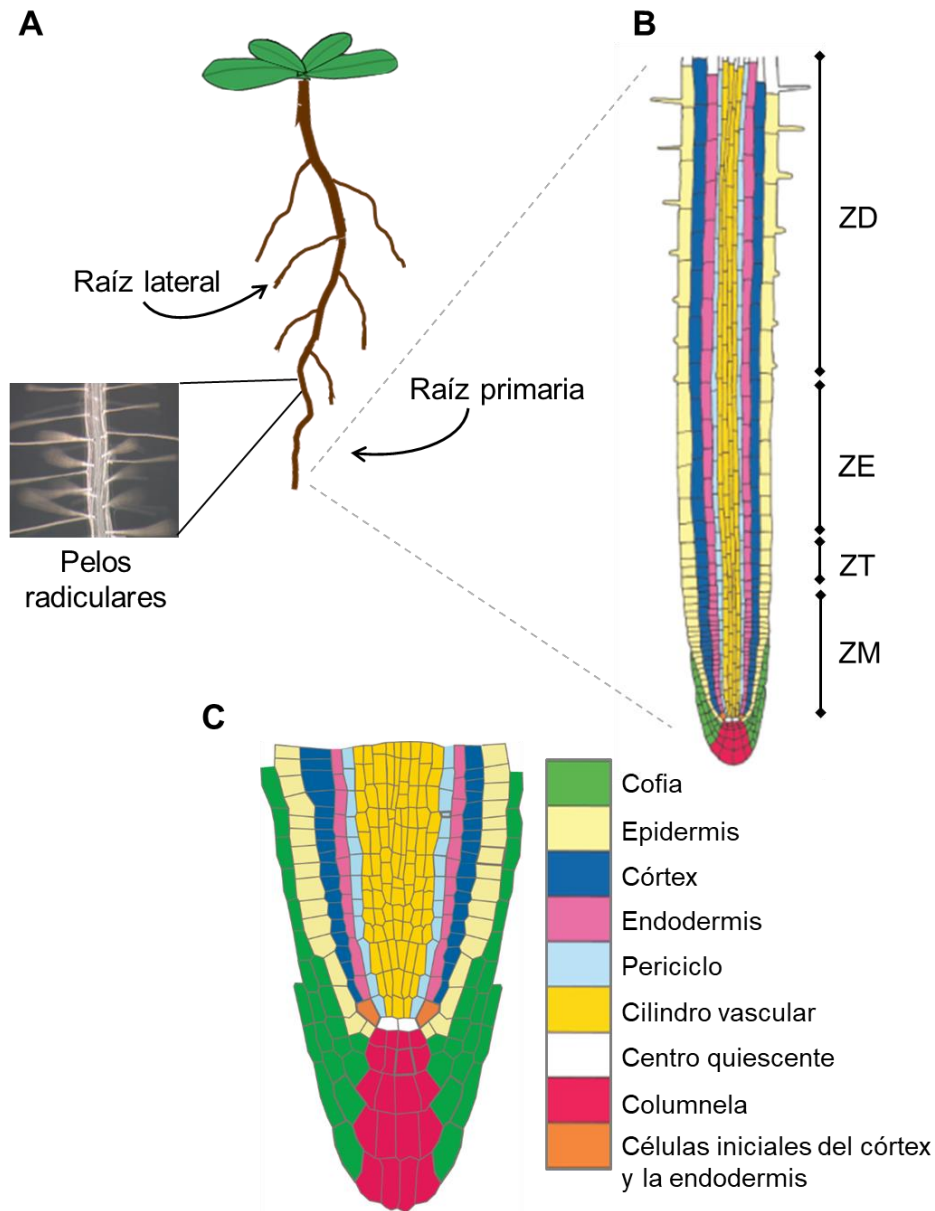


Figura 2. Arquitectura radicular y estructura celular de la raíz. A) Principales elementos de la arquitectura radicular, mostrando RP, RL y PR. B) Zonas celulares que conforman la raíz (ZD: Zona de diferenciación, ZE: zona de elongación, ZT: zona de transición, ZM: zona meristemática). C) Tejidos que conforman la raíz. Modificado de Petersson *et al.* (2019).

2.2 Reguladores del crecimiento vegetal

Debido a su naturaleza sésil, las plantas no pueden escapar de condiciones desfavorables en el ambiente, por lo que ajustan el crecimiento, desarrollo y defensa para sobrevivir. El metabolismo celular involucra una red compleja de señales moleculares que facilitan la comunicación entre diferentes vías de señalización, así

como de los procesos que estas regulan y la respuesta ante diferentes estímulos. En muchos casos, estas señales tienen efectos antagónicos o sinérgicos, dependiendo del sitio donde se producen, el nivel de producción y la temporalidad del proceso.

Los grupos de reguladores del crecimiento mejor caracterizados son las auxinas, las citocininas, las giberelinas, los brassinoesteroides, el ácido abscísico (ABA) y el etileno (Shan *et al.*, 2012). De estas, las auxinas tienen gran relevancia para la arquitectura radicular, pues los gradientes de auxinas se encargan de mantener la división y la elongación celular (Enders y Strader, 2015). La auxina más abundante en las plantas es el ácido indol-3-acético (AIA) y se sintetiza a partir de una ruta dependiente de L-Triptófano (L-Trp) y otra independiente del mismo; su biosíntesis ocurre en todos los tejidos, aunque se produce mayormente en las hojas jóvenes y los meristemas (Woodward y Bartel, 2005).

Además de funcionar como reguladores de procesos de crecimiento, las fitohormonas también juegan un papel importante en mediar la adaptación de la planta ante diferentes condiciones ambientales, ya sea de tipo biótico o abiótico.

2.3 Ácido jasmónico

Entre las hormonas de defensa más importantes, encontramos al AJ y sus derivados, llamados jasmonatos. Estos son compuestos de naturaleza lipídica, pertenecientes al grupo de las oxilipinas, sintetizados a partir del ácido linolénico. Dentro de los jasmonatos se incluyen al mismo AJ, al metil jasmonato (MeJA) y al 12-oxofitodienoato (OPDA), pero la hormona bioactiva en *Arabidopsis* es un conjugado del AJ con isoleucina, el jasmonoíl-isoleucina (AJ-Ile) (Creelman y Mullet, 1997). Los jasmonatos controlan la expresión de genes de defensa en respuesta al daño celular en las plantas y tienen similitud estructural con las prostaglandinas y leucotrienos que producen los animales en procesos inflamatorios tras una lesión, infección o en respuesta a compuestos xenobióticos (Salmon y Higgs, 1987).

Los jasmonatos fueron descubiertos inicialmente con el MeJA, un compuesto aromático aislado de la especie de jazmín, *Jasminum grandiflorum*, y también se

aisló AJ de cultivos del hongo *Lasiodiplodia theobromae*. Posteriormente se demostró su ubicuidad en todas las plantas terrestres (Demole *et al.*, 1962; Aldridge *et al.*, 1971; Meyer *et al.*, 1984). Incluso se tiene reportado que *Marchantia polymorpha*, la especie más ancestral en el linaje de plantas terrestres, es capaz de producir OPDA, el precursor del AJ (Bowman *et al.*, 2017). Los jasmonatos inicialmente fueron descritos como sustancias inhibidoras del crecimiento y que, adicionadas de manera exógena, promovían la senescencia; posteriormente se determinó que dichos efectos se deben a las altas concentraciones aplicadas, comparado con la concentración fisiológica normal (Parthier, 1991). Los niveles de esta fitohormona pueden variar según el tejido en el que se encuentre, la etapa de desarrollo, o según los estímulos que perciba del ambiente; aunque los niveles más altos de jasmonatos se encuentran más comúnmente en los tejidos en crecimiento y en órganos reproductivos (Creelman y Mullet, 1997). Los niveles de AJ se elevan de manera rápida y transitoria por las perturbaciones mecánicas del ambiente, como el enrollamiento o la pérdida de turgencia ocasionados por la escasez de agua, o el viento y el tacto, así como algunos elicitores como quitosanos provenientes de la pared celular de hongos o por inductores peptídicos como la sistemina (Creelman y Mullet, 1997).

Además de su papel como hormonas de defensa, los jasmonatos cumplen una importante función como reguladores del crecimiento, al redirigir recursos de los programas de desarrollo hacia los procesos de defensa en caso de ser necesario; por ejemplo, cuando hay una lesión en la parte aérea, modifican la tasa de crecimiento de la raíz para que exista un balance entre el crecimiento de los diferentes órganos aun cuando alguno de ellos se encuentre dañado. La impedancia mecánica durante el crecimiento de la raíz también induce mayor acumulación de AJ, afectando al desarrollo radicular (Nguyen *et al.*, 2017).

2.3.1 Biosíntesis, transporte y señalización del AJ

El nivel, la distribución y la acumulación intracelular de AJ está finamente regulada a nivel tejido específico y en respuesta al daño. La síntesis del AJ comienza en los cloroplastos, a partir del ácido linolénico (**Fig. 3A**); éste se libera de los

galactolípidos presentes en la membrana del cloroplasto y es oxidado por acción de las 13-lipoxigenasas (13-LOX), produciéndose ácido 13-(S)-hidroperóxido octadecatrienoico (13-(S)-HPOT). Posteriormente, este 13-(S)-HPOT se deshidrata y se convierte en óxido de aleno (AO). En la tercera y última reacción que ocurre en el cloroplasto, el AO es convertido en ácido oxo-fitodienoico (OPDA) por acción de la ciclasa de óxido de aleno (AOC) y es transportado al peroxisoma. La salida del OPDA desde los cloroplastos es mediada por un transportador localizado en la parte externa de su membrana, llamado JASSY, mientras que la entrada a los peroxisomas depende parcialmente del transportador AtABCD1 (Wasternack y Feussner, 2017; Guan *et al.*, 2019).

Dentro del peroxisoma, el OPDA se oxida a ácido 3-oxo-2(2'(Z)-pentenil)-ciclopentano-1-octanoico (OPC:8), mediante la OPDA reductasa 3 (OPR3), seguido de tres β -oxidaciones llevada a cabo por diferentes enzimas: primero las acil-CoA sintetasas (ACS) y después participan de manera secuencial las acil-CoA-oxidasa (ACX) y proteínas multifuncionales (MFP). El primer jasmonato que se obtiene, el 7-iso-AJ, es liberado del peroxisoma hacia el citoplasma, y éste es el punto de partida para sintetizar distintos metabolitos derivados del AJ (Creelman y Mullet, 1995). Uno de estos es el conjugado con isoleucina, el jasmonoil-isoleucina (AJ-Ile), el cual es la forma más bioactiva descrita, a través de JAR1 (Staswick y Tiryaki, 2004), mientras que la desconjugación es llevada a cabo por IAA-Ala-Resistant 3 (IAR3) e IAA-Leu-Resistant-Like 6 (ILL6). Recientemente se descubrió que la hidroxilación e inactivación del AJ están mediados por enzimas llamadas Jasmonate-Induced-Oxygenases (JOX) (Caarls *et al.*, 2017). Otra forma conocida de AJ, es el MeJA, el cual se forma por una metilación del AJ en su grupo carboxilo por la AJ-metiltransferasa (JMT); por su parte, para producir conjugados con otros aminoácidos, participan las enzimas JAR1 y JAR4 (Staswick, 2009).

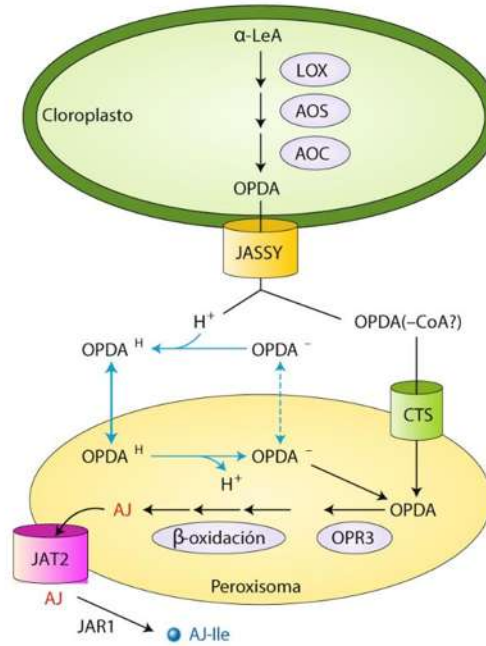
Tras un daño en la planta se induce la producción de sistemina, una molécula señal que se transmite a los tejidos adyacentes a través del apoplasto y el floema. La sistemina induce la producción de AJ y AJ-Ile, que actúan como moléculas señal y se transportan a los sitios adyacentes para emitir las respuestas de defensa. En

cambio, la transmisión a larga distancia ocurre a través de los tejidos vasculares o por aire en el caso del MeJA, el cual sí es capaz de penetrar fácilmente las membranas y tiene mayor volatilidad en comparación con el AJ (Ruan *et al.*, 2019).

Para que el AJ-Ile sea percibido por el receptor, es necesario que este ingrese al núcleo de la célula; el transportador Jasmonate Transporter 1 (JAT1) presenta dos sitios de localización, en la membrana que envuelve al núcleo y en la membrana plasmática, y es capaz de mediar el flujo de AJ-Ile hacia el núcleo, así como el flujo de AJ hacia afuera de la membrana plasmática (Wang *et al.*, 2019). Se han encontrado cuatro homólogos de este transportador, JAT2-5. En el caso de JAT2, este se encuentra en los peroxisomas y facilita el transporte de AJ hacia el citosol, mientras que JAT3, 4 y 5, se localizan en la membrana y posiblemente estén involucrados en la distribución subcelular de los jasmonatos. Por otro lado, se propone que el transporte a distancia desde los tejidos dañados hacia aquellos sanos, es mediado por el transportador de *Arabidopsis*, Glucosinolate Transporter 1 (GTR1) (Ishimaru *et al.*, 2017).

En el núcleo, el AJ-Ile es percibido por el receptor COI, una proteína de tipo caja-F, similar a los receptores de auxinas. Este es componente de una E3 ubiquitin-ligasa y se asocia a proteínas SKP1 y CULLIN (CUL), para formar el complejo SCF^{COI1}, que ubiquitina a los represores JAZ para su posterior degradación vía el proteosoma 26S (**Fig. 3B,C**). Hasta la fecha se tienen reportadas 13 proteínas JAZ en *Arabidopsis*, y la mayoría cuentan con dos dominios conservados, Jas y ZIM. Los JAZ interactúan con el receptor COI1 a través del dominio Jas, y con el factor transcripcional MYC2 a través del dominio ZIM. MYC2 es un factor transcripcional que regula la expresión de genes de respuesta a AJ, pero no es el único, pues otros factores de transcripción, como NAC, ERF y WRKY, también están involucrados en la señalización (Wasternack y Strnad, 2016).

A



B

Condiciones normales

Condiciones de estrés

C

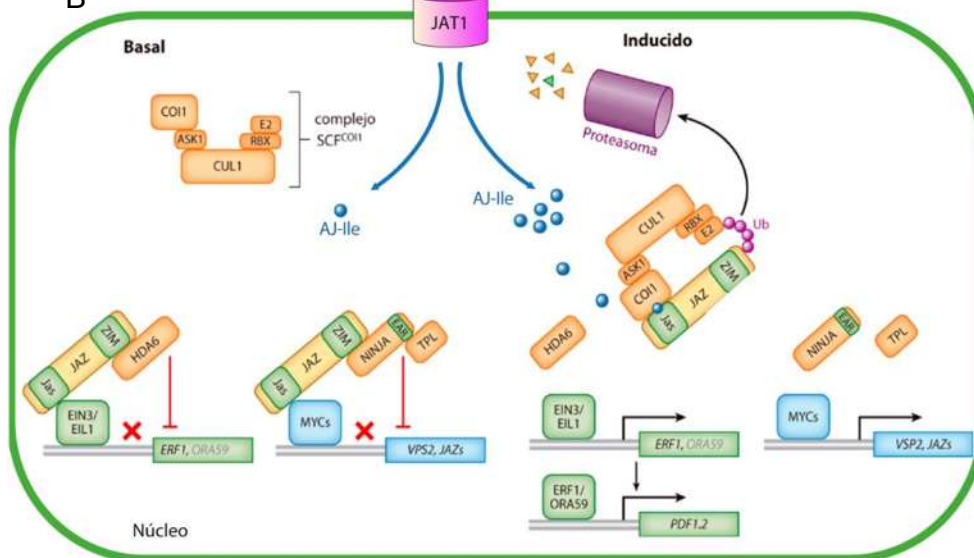


Figura 3. Ruta metabólica del ácido jasmónico. A) Biosíntesis de AJ. Esta da inicio en el cloroplasto, a partir del ácido linolénico (α -LeA), el cual se transforma en OPDA mediante tres reacciones enzimáticas; después el OPDA se convierte en AJ en el peroxisoma y se libera al citoplasma. B) Señalización de AJ en condiciones normales. Los represores JAZ mantienen reclutados a los FT, evitando la activación de genes de respuesta. C) Señalización en condiciones de estrés. El AJ-Ile se une al receptor COI1, provocando la degradación de los represores y liberando a los FT para activar los genes de respuesta. Modificado de Pieterse *et al.*, (2012) y Wasternack y Hause (2019).

La activación de los jasmonatos implica una acción sinérgica junto con otras fitohormonas; y es esta combinación entre hormonas, su composición y duración, lo que determina si los tejidos de la planta se vuelven más susceptibles o resistentes al patógeno que la está atacando (Verhage *et al.*, 2010). Una de las interacciones más importantes del AJ es con el etileno, y la integración entre ambas vías de señalización está mediada por los factores de transcripción de la familia ERF/AP2, como ERF1 y ORA59, que se inducen únicamente por la acción simultánea de ambas hormonas. El AJ y el etileno se producen juntos ante el ataque de patógenos necrotróficos y actúan en sinergia para activar la expresión de los genes ERF, incluyendo ERF1 que está regulado transcripcionalmente por EIN3 y EIL1, así como por la interacción con los represores JAZ.

2.4 Neurotransmisores como reguladores del crecimiento

Además de los fitoreguladores canónicos, existen otras moléculas que se encuentran conservadas entre organismos de los diferentes reinos y que modifican la arquitectura del sistema radicular, por ejemplo, algunos neurotransmisores como el glutamato, el óxido nítrico (ON), la melatonina y la serotonina (López-Bucio *et al.*, 2018; Barrera-Ortiz *et al.*, 2017; Pelagio-Flores *et al.*, 2012). La presencia de dichas moléculas en las plantas ha abierto un amplio campo de investigación sobre el papel de los neurotransmisores en el desarrollo vegetal, el cual había sido poco explorado (Baluška *et al.*, 2020).

2.5 Serotonina

La serotonina (5-hidroxitriptamina) es una indolamina mayormente reconocida por su papel como neurotransmisor en mamíferos, en los que regula el comportamiento, el estado de ánimo y el sueño, además de que funciona como un mitógeno (Lucki, 1998; Olivier, 2015). Su deficiencia en los humanos juega un papel importante en diversas enfermedades, particularmente neurológicas, como la depresión, el Alzheimer y el Parkinson (De Grandis *et al.*, 2010). Incluso es precursor de algunos metabolitos con propiedades alucinógenas, como la bufotenina, la psilocina y la psilocibina (Ramakrishna *et al.*, 2011a).

Esta indolamina se originó desde las primeras formas de vida en la Tierra, en organismos procariontes que la utilizaban como protección ante el estrés abiótico por sus propiedades antioxidantes. Se encuentra en diversas especies procariotas, incluyendo algunas emparentadas con endosimbiontes que pudieron haber dado lugar a la mitocondria y los cloroplastos, organelos altamente expuestos al estrés oxidativo. De hecho, existen varios estudios en los que identificaron receptores de serotonina en estos organismos (Byeon *et al.*, 2014; Erland *et al.*, 2019). Está altamente conservada en bacterias, hongos, protozoarios, animales y plantas, e incluso arqueas, cumpliendo diferentes funciones. Dada esta ubicuidad, se le considera miembro de un grupo ancestral de compuestos reguladores conocido como aminas biogénicas, donde se incluyen indolaminas, catecolaminas y la histamina. Se piensa que estos compuestos cumplieron alguna función durante el proceso evolutivo, como facilitar la señalización intercelular, el desarrollo o respuestas a factores de estrés (Erland *et al.*, 2019). Este grado de ubicuidad entre los organismos puede ser un indicador de la importancia de esta indolamina en la supervivencia y adaptación de los seres vivos.

2.5.1 Descubrimiento y distribución de la serotonina

La serotonina se aisló por primera vez en 1937 en las células enterocromafines del intestino, donde cumple la función de inducir contracciones del músculo liso y fue por esto que inicialmente se le denominó enteramina (Vialli y Erspamer, 1937). Una década después se descubrió en el plasma sanguíneo, donde desempeña una función vasoconstrictora y se le cambió el nombre a serotonina, proveniente del latín “serum”, que significa plasma de la sangre (Whitaker-Azmitia, 1999). Es en la década de 1950 que se documenta su presencia en plantas, en la leguminosa *Mucuna pruriens*, sin embargo, el interés inicial en esta molécula estuvo basado en sus propiedades medicinales que pudieran ser usadas para la industria farmacéutica, por lo que, durante las tres décadas posteriores a su descubrimiento, el avance en la investigación de esta indolamina estuvo limitado. No fue sino hasta muy recientemente que se empezaron a estudiar sus funciones como fitoregulator

a partir de su papel como precursor de melatonina (Bowden et al., 1954; Erland et al., 2019).

Hasta la fecha, se le ha encontrado en más de 90 especies de plantas, pertenecientes a 37 familias, en concentraciones variables dependiendo de la especie, las condiciones de cultivo y su localización geográfica (Erland y Saxena, 2017). La concentración de serotonina también varía según el tejido de la planta, los niveles más altos se encuentran en los tejidos aéreos, principalmente en órganos reproductivos. Esto también va cambiando conforme el estado de maduración; por ejemplo, la concentración de serotonina endógena en la nuez incrementa conforme madura la semilla (Murch et al. 2009). En la raíz del arroz, la serotonina se va acumulando conforme la edad de la planta avanza, y se sintetiza abundantemente en los tejidos senescentes (Erland et al., 2016).

2.5.2 Biosíntesis de la serotonina

La serotonina se sintetiza a partir del L-Trp, un aminoácido producido a partir del corismato por la vía del siquimato, a partir del cual también se producen otros metabolitos de importancia como indol-alcaloides, glucosinolatos y auxinas (**Fig. 4**). Primeramente, el L-Trp se descarboxila mediante la acción de la enzima triptófano-descarboxilasa (TDC) para producir triptamina (TAM), posteriormente, esta se hidroxila mediante la triptamina-5-hidroxilasa (T-5-H) y forma serotonina (Erland et al., 2019). Esta vía es diferente a la ruta de síntesis en animales, donde ocurre de manera inversa: primero se hidroxila el L-Trp, mediante la TDC, para formar 5-hidroxitriptófano, y después este se descarboxila por acción de la aminoácido-aromático-descarboxilasa (Murch et al., 2000).

La principal enzima encargada de regular la vía de las indolaminas es la TDC, lo cual se cree que es un medio para regular la dirección del L-Trp hacia otras rutas biosintéticas o la síntesis de proteínas. Además de los niveles de L-Trp y de TDC, existen otros reguladores importantes en la biosíntesis de serotonina, como su relación con las vías del AJ y etileno, la inducción de estrés biótico, los niveles de

triptamina, e incluso los de IAA. La senescencia también induce la producción de serotonina en algunas especies vegetales (Kim *et al.*, 2009).

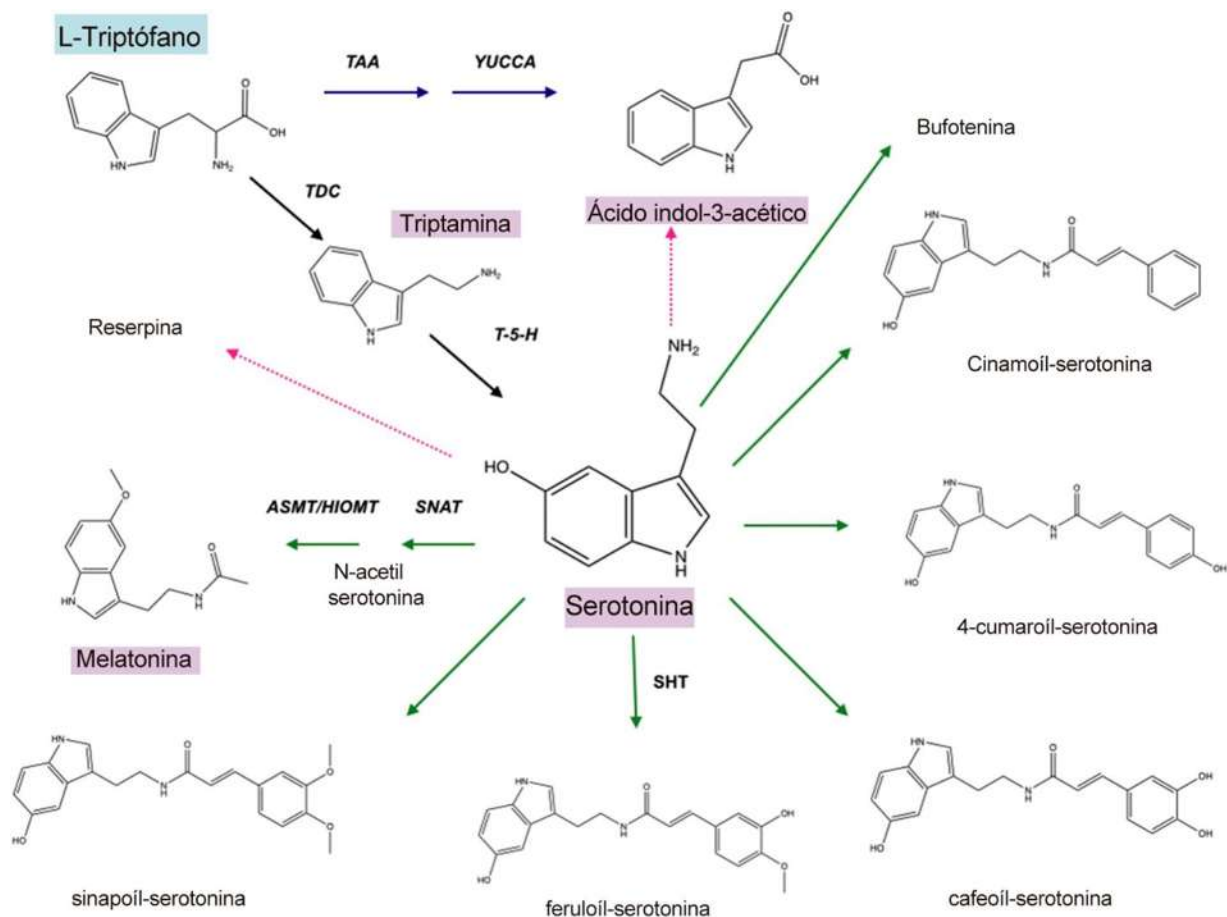


Figura 4. Biosíntesis de la serotonina y sus derivados. En flechas negras se muestra la síntesis de serotonina a partir de L-Trp; las flechas azules indican la ruta de síntesis del ácido indolacético; en flechas verdes, la síntesis de los derivados de serotonina; con flechas rosas interrumpidas se muestran las rutas de serotonina a otros metabolitos cuyos mecanismos aún se desconocen. ASMT: acetilserotonina metiltransferasa; SNAT: serotonina-N-acetil-transferasa; TAA: triptófano aminotransferasa de *Arabidopsis* 1; TDC: triptófano decarboxilasa; T-5-H: triptamina-5-hidroxilasa. Modificado de Erland *et al.*, 2016.

Además, la serotonina funciona como precursor para otros metabolitos, como la melatonina y otros conjugados con ácidos fenólicos. Estos se sintetizan en las mitocondrias y cloroplastos de los diferentes tejidos, lo cual resulta relevante dada su función como molécula antioxidante (Byeon *et al.*, 2014).

2.5.3 Regulación de la fotosíntesis y ritmos circadianos

La serotonina también es capaz de mediar la percepción de la luz, regulando la actividad de los fitocromos. Esto tiene gran implicación sobre los programas de desarrollo vegetal, ya que los fitocromos regulan diversos procesos como las interacciones entre las vías de señalización de las fitohormonas y la fotomorfogénesis, hasta la distribución de carbono, el gravitropismo de la raíz y los ritmos circadianos (Chandok y Sopory, 1994; Schäfer y Bowler, 2002).

Es en los órganos reproductivos donde se encuentran las mayores concentraciones de serotonina, aquí promueve la dormancia de los capullos y retarda el tiempo de floración, regulando la actividad de los fotoreceptores. Los niveles de serotonina incrementan en la época de floración y disminuyen en la etapa previa a la floración (Cooke *et al.*, 2012; Endo *et al.*, 2016). La alelopatía del polen es un proceso que también se ve influenciado por la serotonina. Este es necesario para una fertilización exitosa y de asegurar la compatibilidad de los gametos (Roshchina, 2001; Roshchina, 2006). En conclusión, la serotonina juega papeles importantes en cada etapa de vida de las plantas, desde la supervivencia de los embriones, el desarrollo de las plántulas, su crecimiento y maduración, hasta llegar a los procesos reproductivos y la senescencia.

2.5.4 Efectos sobre el crecimiento vegetal

La serotonina juega un papel importante en procesos de crecimiento y de morfogénesis en las plantas, como la organogénesis, la división y la diferenciación celular que influyen directamente en la producción de biomasa (Erland *et al.*, 2015). Los efectos morfogenéticos de la serotonina se han caracterizado en diferentes especies vegetales. En la planta medicinal *Hypericum perforatum* y en la leguminosa *Mimosa pudica* se reportó que altas concentraciones de serotonina incrementan la producción de tallos en cantidad, altura y peso fresco, y al disminuir la concentración o inhibirla, se afecta la producción de estos (Murch y Saxena, 2002; Ramakrishna *et al.*, 2009).

El balance entre serotonina y melatonina es un factor determinante en las respuestas en la morfogénesis vegetal; bajos niveles de melatonina provocan una inhibición en el crecimiento de la raíz, mientras que altos niveles de serotonina incrementan la organogénesis en follaje. En plántulas de arroz deficientes de la enzima SNAT, se reprime la conversión de serotonina a melatonina, por lo que esta incrementada concentración de serotonina provoca un mayor crecimiento de los coleóptilos, pero menor crecimiento de las plántulas. Por otro lado, plántulas con una sobre expresión de la TDC, las cuales también presentaban incrementados niveles de serotonina, no tuvieron un fenotipo significativamente diferente (Byeon y Back, 2016; Kang *et al.*, 2007).

La señalización de calcio (Ca^{2+}) también parece tener un efecto importante en la embriogénesis somática mediada por la serotonina. En plantas de café, la aplicación de inhibidores de calcio retrasó el crecimiento inducido por la serotonina, pero al adicionar calcio, este crecimiento se restablecía (Ramakrishna *et al.*, 2011b). En explantes de hojas de *Echinacea purpurea* tratadas con thidiazuron, un sustituto sintético de fenilurea que tiene efectos auxínicos y citocínicos, se vio incrementada la producción de serotonina endógena, asociado a una mayor producción de callos (Jones *et al.*, 2007). En girasol (*Helianthus annuus*) la serotonina incrementa el desarrollo del hipocotilo y de la raíz, así como la producción de raíces en explantes de nuez (Mukherjee *et al.*, 2014; Gatineau *et al.*, 1997).

2.5.5 Modulación de la arquitectura radicular y relación con la vía auxínica

Al encontrarse que la serotonina funciona como un regulador del crecimiento vegetal, se abrió controversia respecto a si este efecto ocurría de manera similar, opuesta o si se traslapaba con la vía de señalización de auxinas, debido a la similitud estructural entre ambas moléculas. Se observó que en la raíz de *Arabidopsis*, la adición de serotonina reprime el crecimiento debido a que provoca una serie de cambios dinámicos en los procesos de división y elongación celular (**Fig. 5A**). Pelagio-Flores *et al.*, (2011) observaron que bajas concentraciones de serotonina inducen la ramificación de la raíz primaria, mientras que, altas concentraciones

inhiben dicha ramificación, pero se promueve el desarrollo de raíces adventicias. Mediante el análisis de mutantes de la vía de señalización de auxinas, como AXR1 y AXR2, así como de líneas reporteras inducibles por auxinas, los autores concluyeron que la serotonina actúa de manera antagónica respecto a esta fitohormona (**Fig. 5B**), pues funciona como un inhibidor natural de su ruta de señalización, alterando negativamente programas de desarrollo radicular (**Fig. 5C**). Este efecto es similar al provocado por las citocininas, pues mientras las auxinas se encargan de mantener la dominancia apical y el desarrollo de la raíz, las citocininas actúan de manera antagónica, promoviendo la ramificación de la raíz y el desarrollo de los tallos (Erland *et al.*, 2015).

Más recientemente, se comenzó a dilucidar el mecanismo de acción a través del cual la serotonina antagoniza la señalización de auxinas. Wan *et al.* (2018a) mostraron que la serotonina disminuye la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de auxinas como *TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS1* (*TAA1*), *SUPERROOT1* (*SUR1*), *YUCCA2* (*YUC2*), *YUC9*, así como a los transportadores PIN2 y AUX1. PIN2 es un transportador que lleva las auxinas hacia afuera de la célula y regula el gravitropismo en la raíz, mientras que AUX 1 es un transportador de influjo, es decir, lleva a las auxinas hacia dentro de la célula. Los autores concluyeron que la serotonina afecta el contenido endógeno de auxinas en el meristemo, su transporte al meristemo y zona de elongación y por consecuencia, los programas de desarrollo radicular.

El nicho de células iniciales es un blanco importante de la serotonina, cuya aplicación causa una expresión disminuida de los genes *PLETHORA1* y *PLETHORA2*, que codifican factores de transcripción encargados del mantenimiento del meristemo (Pelagio-Flores *et al.*, 2011; Wan *et al.*, 2018b).

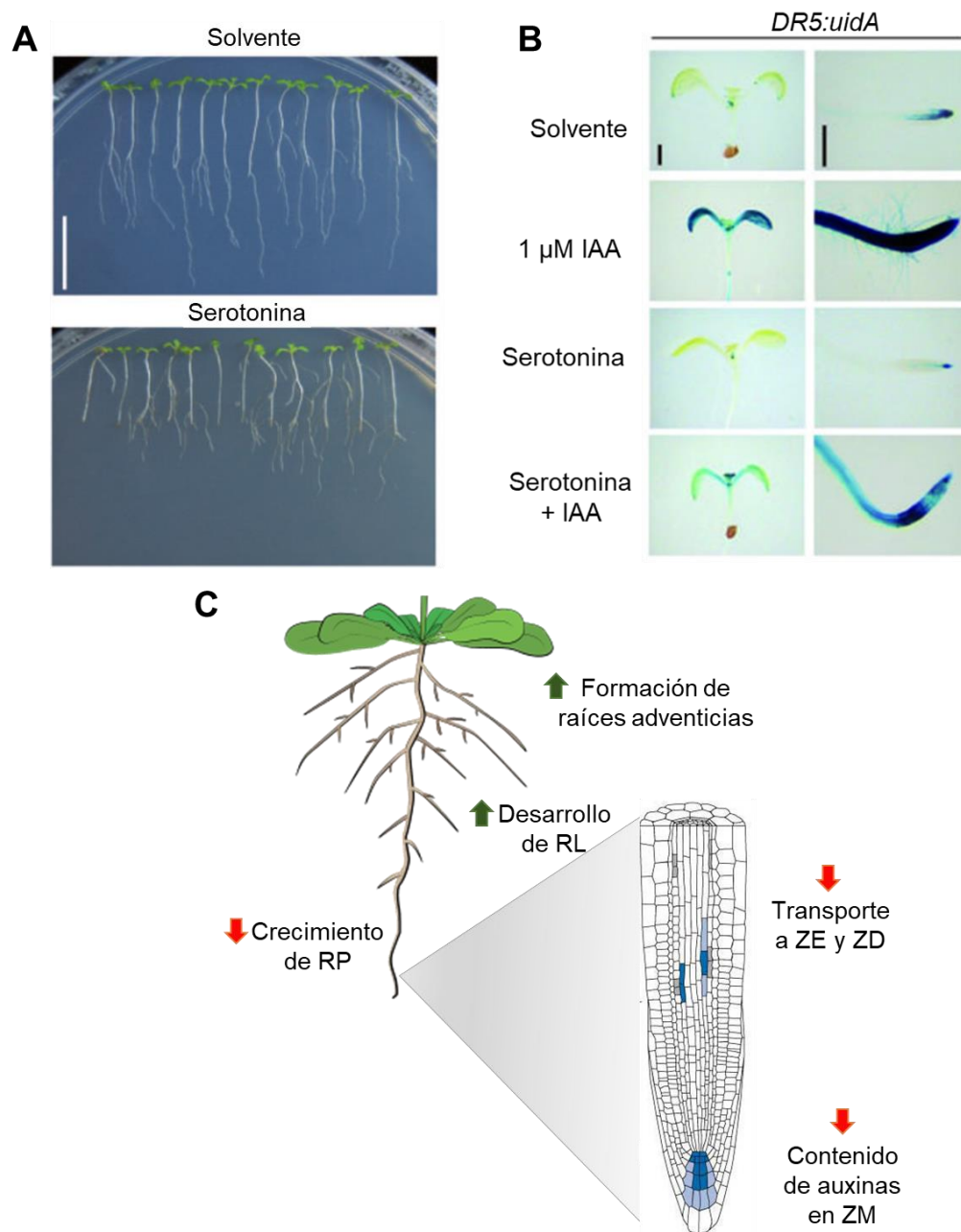


Figura 5. Efectos de la serotonina sobre la raíz. A) Imágenes representativas del desarrollo de raíces adventicias en explantes de hipocotilos tratados con y sin serotonina. B) Efecto de la serotonina sobre la expresión de *DR5*, un promotor inducible por auxinas. C) Conjunto de cambios ocasionados por la serotonina sobre la arquitectura radicular y el contenido de auxinas. Las flechas verdes representan una inducción y las flechas rojas, represión. Modificado de Pelagio-Flores *et al.*, (2016).

2.5.6 Papel de la serotonina en la regulación de hormonas de defensa

Aparte de las auxinas, existen algunos estudios en los que se relaciona a la serotonina con la activación de algunas hormonas de defensa, como el AJ, el etileno

y el ABA. En un análisis por Kang *et al.* (2009), se encontró que los genes de biosíntesis de serotonina se activan por AJ y ABA. Los tratamientos con ABA producen una mayor síntesis de serotonina en plantas de arroz, lo cual induce la senescencia. Por su parte, altas concentraciones de serotonina inducen la señalización de AJ y su efecto está modulado por los genes *COI1* y *JAR1*, así como *ETR1*, *EIN2* y *EIN3* de la vía del etileno. Cascada abajo del AJ, actúan las ERO, las cuales son pieza clave en los cambios en el desarrollo del meristemo provocados por la serotonina (Pelagio-Flores *et al.*, 2016).

2.6 Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son moléculas que se generan de manera natural y constante durante procesos metabólicos en todos los organismos aerobios; esto ocurre debido a que los procesos celulares que involucran un rápido movimiento de electrones o transporte de energía en presencia de oxígeno, conllevan inevitablemente a una fuga de electrones o energía en forma de O₂, formándose estas moléculas consideradas como metabolitos del oxígeno, parcialmente reducidos, con una fuerte capacidad oxidante (Bayr, 2005). Las principales ERO se producen por la ruptura o la excitación del oxígeno (oxígeno atómico, ozono y el oxígeno singlete), o bien, las parcialmente reducidas (anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo). Cada tipo de ERO tiene una capacidad oxidativa diferente y afectan a diferentes reacciones bioquímicas y fisiológicas (Thannickal y Fanburg, 2000).

Los efectos negativos que puede llegar a provocar una elevada cantidad de ERO incluyen la peroxidación de los lípidos de la membrana cuando las ERO reaccionan con los ácidos grasos insaturados, que conlleva a una rápida desecación y muerte celular. También dañan las proteínas al causar modificaciones en ciertos aminoácidos, fragmentar la cadena peptídica e incrementando la susceptibilidad a la proteólisis. Incluso, las ERO pueden inducir un gran número de lesiones en el ADN, como deleciones, mutaciones que pueden causar defectos genéticos letales (Ahmad *et al.*, 2008).

La producción y distribución de ERO varía en cada tejido e incluso en cada organelo celular (**Fig. 6**). En los tejidos fotosintéticos, los cloroplastos son la principal fuente de producción de ERO, debido a que están produciendo oxígeno constantemente durante el transporte de electrones en la fase luminosa de la fotosíntesis, y simultáneamente es removido durante la reducción y asimilación (Apel y Hirt, 2004). En los cloroplastos se producen grandes cantidades de anión superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), especialmente cuando baja la tasa de fijación de carbono fotosintético, como ocurre en situaciones de estrés. Además, los cloroplastos también pueden producir oxígeno singlete (1O_2) en situaciones de estrés, pues se afecta la estabilidad en la distribución de electrones, lo que lleva a la excitación de moléculas de clorofila, generando el 1O_2 .

Por otra parte, en los tejidos no fotosintéticos de la planta, la principal fuente de ERO es la mitocondria que, en comparación con los cloroplastos, su producción es muy baja (Huang *et al.*, 2019). Los peroxisomas son la tercera fuente más importante de ERO. Estos contienen gran cantidad de oxidasas que producen H_2O_2 y O_2^- como subproductos de las reacciones que catalizan (Foyer y Noctor, 2009).

Aparte de las fuentes metabólicas de ERO mencionadas anteriormente, estas también pueden producirse bajo la presencia de metales de transición para formar radicales hidroxilo (OH) a partir de H_2O_2 mediante la reacción de Fenton, o a partir de H_2O_2 y O_2^- mediante la reacción de Haber-Weiss. El radical OH es el más reactivo de todas las ERO y rápidamente puede causar un grave daño oxidativo a la célula; puede oxidar los polisacáridos de la pared celular, provocando que esta se afloje o desintegre, e igualmente puede inducir una ruptura en una hebra de la cadena de ADN. No existe evidencia de que el OH por sí solo participe en algún mecanismo de señalización, pero algunos de sus productos sí pueden ejercer algunas funciones de señalización (Jaspers *et al.*, 2010).

El 1O_2 es una molécula menos estable que el oxígeno triplete o molecular. Además de los pigmentos de la clorofila, el 1O_2 también puede ser producido a partir de la actividad de las LOX. El 1O_2 se encuentra durante periodos de tiempo muy cortos y es extremadamente inestable dentro de las células, pero es capaz de oxidar lípidos,

proteínas y residuos de guanina en el ADN, y tiene un gran impacto sobre la fotosíntesis (Krieger-Liszkay, 2005).

Por su parte, el O_2^- se produce por la reducción univalente del oxígeno, es decir, cuando el oxígeno acepta un electrón; es el precursor de varias ERO por su inestabilidad y una gran capacidad de óxido/reducción. El O_2^- es capaz de mantener la estabilidad de las células indiferenciadas, pero en grandes cantidades puede elevar la cantidad de otras ERO, llevando a la muerte celular. Estos reaccionan con la superóxido dismutasa (SOD) para formar H_2O_2 .

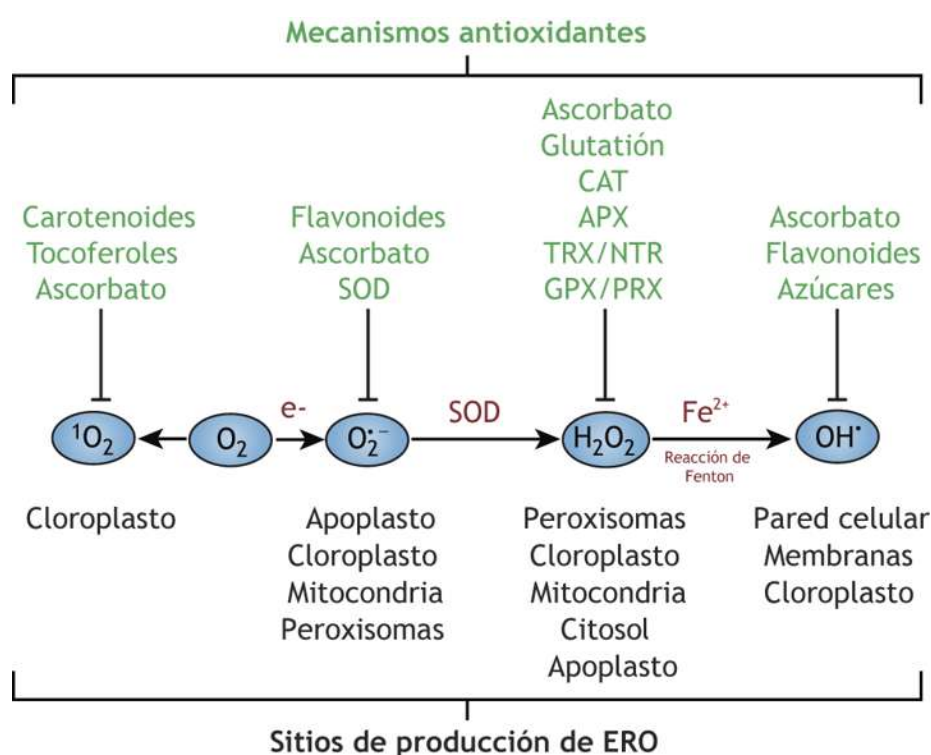


Figura 6. Producción de ERO en plantas y sus mecanismos de eliminación. En óvalos azules se presenta el oxígeno y las ERO derivadas de él; enlistados abajo están sus principales sitios de producción y en verde, sus mecanismos antioxidantes. Modificado de Mhamdi y Van Breusegem (2018).

En contraste con las demás ERO, el H_2O_2 es una molécula más estable, por lo que es la que tiene un papel más importante como molécula señal. El H_2O_2 se produce a partir de los radicales superóxido, por una dismutación en los cloroplastos con una

reacción comúnmente catalizada por la SOD. Este puede dar lugar al OH, o bien, ser convertido en H₂O mediante el ascorbato y el glutatión (Choudhary *et al.*, 2020). Entre todas las anteriores, el H₂O₂ es considerado una importante molécula redox, dado sus propiedades químicas y fisiológicas, así como su estabilidad dentro de las células.

La producción y remoción de ERO debe estar en equilibrio dentro de la célula, sin embargo, este equilibrio puede verse perturbado fácilmente por una diversa cantidad de condiciones abióticas adversas, como una gran cantidad de luz, sequías, bajas o altas temperaturas, así como estrés mecánico.

2.6.1 Mecanismos antioxidantes

Al ser moléculas altamente reactivas, las ERO tienen la capacidad de dañar el ADN, otras moléculas y estructuras celulares, provocando un estallido oxidativo de la célula al acumularse en grandes cantidades (Apel y Hirt, 2004). Sin embargo, las células vegetales cuentan con antioxidantes y enzimas que se encargan de eliminarlas y así mantener los niveles de ERO bajos en condiciones normales de crecimiento. Bajos niveles de ERO son necesarios para que se lleven a cabo diversos procesos de desarrollo, como la división y diferenciación celular (Tsukagoshi *et al.*, 2010). Sin embargo, bajo condiciones de estrés, las plantas generan una mayor cantidad de ERO, provocando una mayor acumulación de estas dentro de la célula, que regulan varios procesos como la defensa ante ataques por patógenos, apoptosis y la apertura de los estomas (Gill y Tuteja, 2010; Schippers *et al.*, 2016).

Los mecanismos que utilizan las plantas para eliminar el exceso de ERO pueden clasificarse en dos tipos: enzimáticos y no enzimáticos. Estos actúan de manera sinérgica para neutralizar los radicales libres. Los sistemas antioxidantes enzimáticos incluyen principalmente a la superóxido dismutasa (SOD), catalasas (CAT), la ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR), dehidroascorbato reductasa (DHAR), glutatión-S-transferasa (GST) y la glutatión peroxidasa (GPX). A diferencia de otros organismos, las plantas tienen múltiples genes que codifican

para SOD y APX, sus diferentes isoformas están dirigidas de manera específica a los cloroplastos, mitocondria, peroxisomas, así como al citosol y el apoplasto (Apel y Hirt, 2004). Los sistemas no enzimáticos incluyen principalmente antioxidantes de bajo peso molecular, como el glutatión, ácido ascórbico, tocoferol, flavonoides, carotenoides y alcaloides, siendo el ascorbato y el glutatión los más importantes (Apel y Hirt, 2004; Choudhary *et al.*, 2020). En cuanto a los radicales OH, no existen moléculas que se encarguen de eliminarlos, por lo tanto, la única manera de evitar el daño oxidativo ocasionado por ellos es controlando las reacciones que llevan a su formación (Pitzschke *et al.*, 2006).

Cuando la cantidad de ERO dentro de las células excede la capacidad de estos sistemas antioxidantes para eliminarlas, se dice que la célula se encuentra bajo estrés oxidativo. Pero cuando existe un bajo nivel de ERO, la célula se encuentra en un estado reducido y las ERO pueden actuar como segundos mensajeros que participan en distintos procesos biológicos (Huang *et al.*, 2019).

2.6.2 Función como molécula señal y efectos sobre el desarrollo vegetal

Las ERO juegan un papel importante en la regulación de diversos programas de desarrollo vegetal. La transición entre las fases de división, de elongación, hasta llegar al estado de diferenciación, son procesos mediados por ERO, pues es la distribución de estas lo que definirá marcadamente cada una de las zonas celulares en la raíz de *Arabidopsis*. El H_2O_2 se acumula principalmente en la ZE y ZD, mientras que el O_2^- está localizado en la ZM, y es en la ZT donde la acumulación de H_2O_2 y O_2^- se traslapa (**Fig. 7**). El equilibrio entre estas dos ERO es regulado por el factor transcripcional UPBEAT1 (UPB1), a través de la regulación negativa de genes que codifican para una serie de peroxidasas (Tsukagoshi *et al.*, 2010).

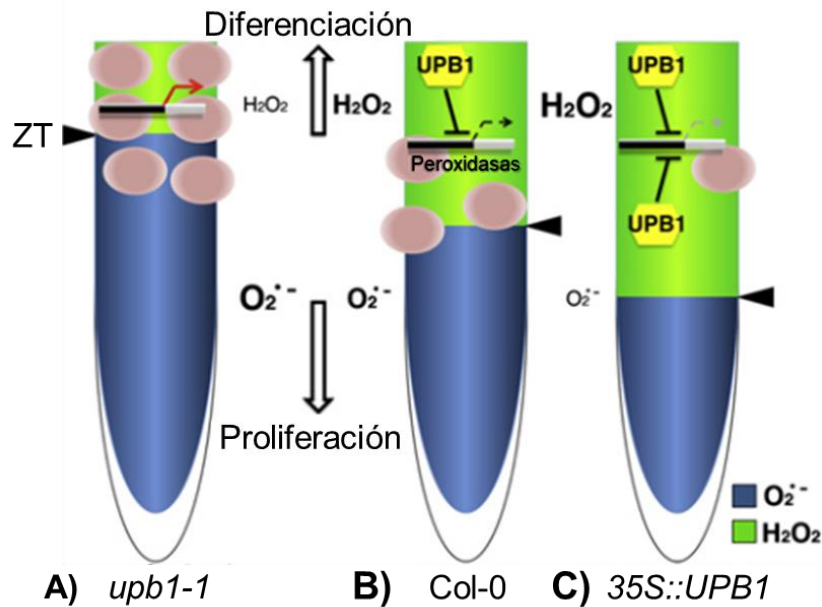


Figura 7. Modelo de la regulación en el tamaño del meristemo, a través de ERO y UPB1. A) La mutante *upb1-1* presenta una sobreproducción de peroxidasas, lo que conlleva a mayor producción de O_2^- y crecimiento de la ZM (mostrado en azul). B) En plantas normales el O_2^- se acumula en la ZM, mientras que el H_2O_2 se acumula desde la ZE hacia arriba, mostrado en verde. UPB1 reprime la expresión de peroxidasas (círculos rosas) en la ZE. C) La línea sobreexpresora de UPB1 reprime la acción de peroxidasas, aumentando la cantidad de H_2O_2 y reduciendo la ZM. Modificado de Tsukagoshi *et al.* (2010).

El H_2O_2 es un regulador negativo de la actividad del meristemo apical de la raíz, pues al ser aplicado de manera exógena, reduce el número de células meristemáticas en esta zona. Además, en presencia de estrés genotóxico, se acumula H_2O_2 a través de la proteína FLAVIN-CONTAINING MONOOXYGENASE 1 (FMO1) y se reduce el tamaño del meristemo (Tsukagoshi *et al.*, 2010). El H_2O_2 y el O_2^- también están asociados al mantenimiento y diferenciación del meristemo apical aéreo, al regular la expresión del factor transcripcional WUSCHEL (WUS), así como la estabilidad de PLETHORA2, una proteína involucrada en la señalización de auxinas y etileno (Zeng *et al.*, 2017; Yamada *et al.*, 2019). Las ERO también son capaces de modular el crecimiento apical, mediante la regulación de la actividad de los canales de Ca^{2+} , modificando las propiedades de la pared celular (Foreman *et al.*, 2003). El H_2O_2 y el O_2^- también son reguladores del desarrollo de raíces laterales al promover su elongación (Manzano *et al.*, 2014). Por otra parte, actúan a través

de las proteínas RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOGS (RBOH) y de UPB1 para facilitar el brote de nuevos primordios (Fernández-Marcos *et al.*, 2017).

Las ERO son reguladores importantes de la actividad de diversas fitohormonas, como las giberelinas, las auxinas, el ácido abscísico, los brassinoesteroides, el AJ y el etileno. A través de la regulación en el metabolismo del ácido giberélico, las ERO regulan la germinación de la semilla en *Arabidopsis*, así como el desarrollo de los cotiledones (Zimmermann *et al.*, 2006). Por su parte, la regulación de la homeostasis de auxinas es afectada por el H_2O_2 , que media el transporte polar de auxinas afectando directamente a los transportadores PIN (Potters *et al.*, 2009). Las ERO también regulan la senescencia a través de las auxinas y citocininas (Mhamdi y Van Breusegem, 2018). El ABA y los brassinoesteroides requieren de una regulación del estado redox a través de la producción de ERO; el ABA, por su parte, induce la producción de H_2O_2 , lo que activa los canales de Ca^{2+} para incrementar el Ca^{2+} citosólico, provocando el cierre estomático (Kwak *et al.*, 2003). Incluso participa como regulador negativo de la germinación de la semilla o induciendo la dormancia, al modular la producción de ERO (Ishibashi *et al.*, 2012). Los brassinoesteroides, por su parte, incrementan los niveles celulares de H_2O_2 , lo que promueve el desarrollo del meristemo (Tian *et al.*, 2018).

Incluso, hormonas de defensa como el ácido salicílico (AS) controlan la producción de ERO para mediar las respuestas a estrés y las rutas que llevan a la célula a apoptosis; pues aumenta la cantidad de ERO al haber contacto con un patógeno, al reducir los sistemas antioxidantes. Además, mejora la tolerancia de las plantas al estrés abiótico, aumentando la acumulación de H_2O_2 (Guo *et al.*, 2017). Esta regulación actúa sinérgicamente con el AJ para controlar los niveles de ERO y eventualmente contribuir a la apoptosis (Almagro *et al.*, 2009; Mur *et al.*, 2006).

2.6.3 ERO en la señalización de serotonina

Como se mencionó anteriormente, la serotonina actúa como modulador de los niveles de ERO en la raíz (**Fig. 8A**). Esta induce la acumulación de H_2O_2 en la zona de elongación, a la vez que disminuye la acumulación de O_2^- en el meristemo, a

través de la proteína UPB1. Esto provoca un desbalance en el equilibrio de ERO, conllevando a una inhibición en el crecimiento de la raíz (Wan *et al.*, 2018b). Dicha regulación está relacionada con las vías de señalización del ácido jasmónico y del etileno (Pelagio-Flores *et al.*, 2016; Mukherjee, 2018).

La serotonina también juega un papel importante en la eliminación de ERO. Bajo condiciones de estrés por frío y salinidad, la serotonina incrementa las enzimas antioxidantes CAT, SOD y peroxidasas que disminuyen la cantidad de ERO en *Brassica napus* (He *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2021). Una función adicional es en la resistencia a patógenos, pues hay un reforzamiento de las paredes celulares debido a una acumulación inducida de serotonina en respuesta a la infección por bacterias patógenas (Kang *et al.*, 2009).

El potencial que posee la serotonina como antioxidante la sitúa como un importante regulador de la senescencia. Esta protege al parénquima del xilema y las células acompañantes del daño oxidativo, permitiendo el reciclaje de nutrientes de las hojas senescentes a los tejidos nuevos. En el arroz, la acumulación de serotonina en las hojas senescentes permitió una disminución de los niveles de ERO y la peroxidación de los lípidos de la membrana (Kang *et al.*, 2009). Además, la serotonina reduce la acumulación de triptamina, un metabolito tóxico para la planta, y mantiene el potencial reductor de las células gracias a su actividad antioxidante.

La producción de ERO en los diferentes organelos conlleva indudablemente a cambios en la expresión global de genes, pero aún no está claro cómo ocurre. Se proponen tres mecanismos de acción mediante los cuales las ERO pueden afectar la expresión genética: 1) los sensores de ERO podrían ser activados para inducir cascadas de señalización que afecten la expresión de genes, 2) algunos componentes de estas cascadas pueden ser directamente oxidados por las ERO, o 3) las ERO pueden cambiar la expresión génica modificando la actividad de factores de transcripción (Apel y Hirt, 2004). La señalización mediada por ERO involucra proteínas G heterotriméricas y fosforilación de proteínas regulado por MAPK y fosfatasa, lo cual se aborda a continuación.

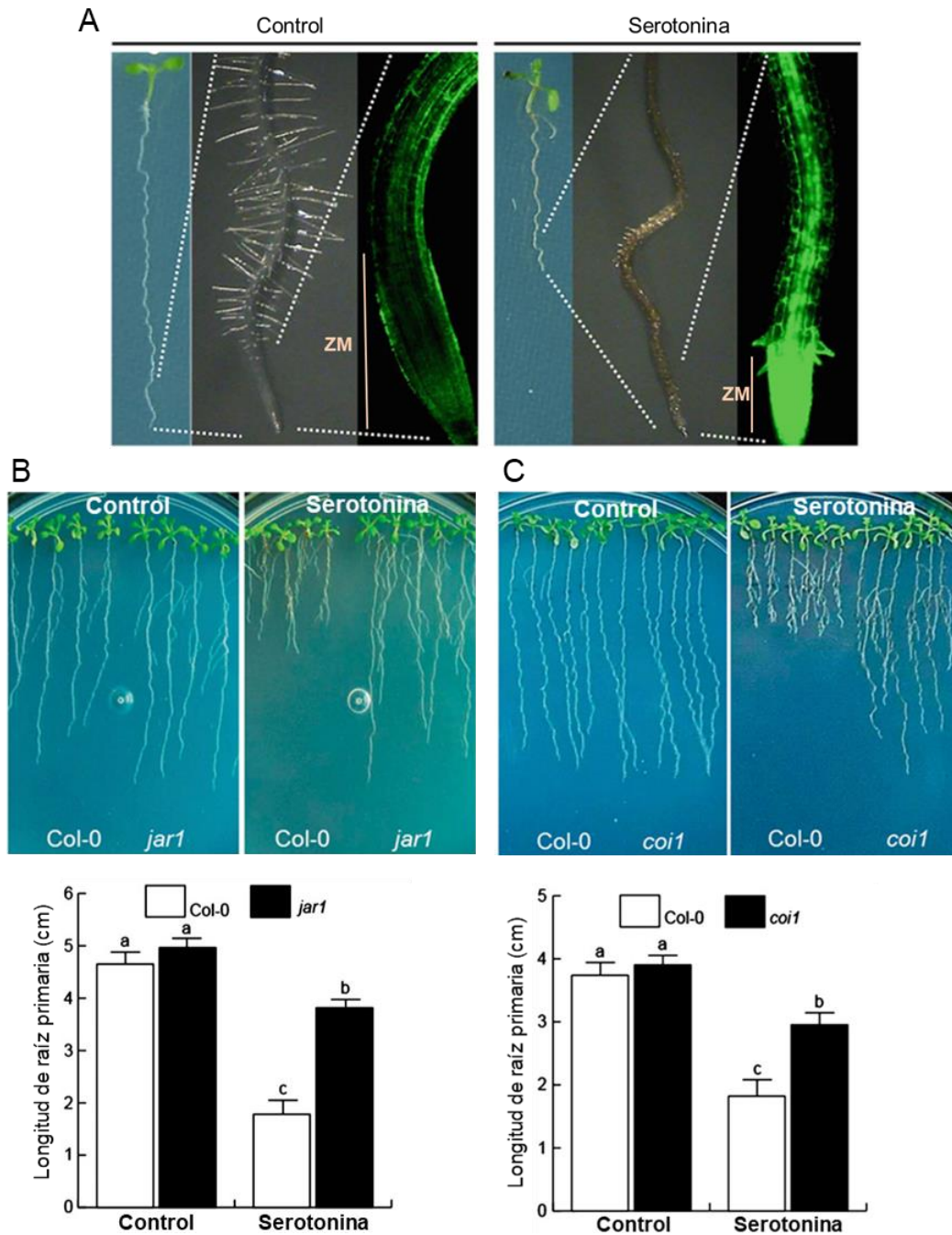


Figura 8. La serotonina disminuye el crecimiento de la raíz mediante la señalización de ácido jasmónico y el incremento de ERO. A) La serotonina induce la producción de ERO en la zona meristemática, reduciendo su tamaño. B,C) Las mutantes *jar1* y *coi1* son resistentes al efecto de la serotonina, indicando un papel clave de la vía de señalización del ácido jasmónico como regulador de la respuesta a la indolamina. Modificado de Pelagio-Flores *et al.* (2016).

2.7 Proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK)

La fosforilación de proteínas es el mecanismo de regulación celular más común en diversos procesos biológicos, pues al añadir o quitar un grupo fosfato de una proteína es posible obtener un cambio importante en su estructura y funcionalidad (Luan, 2003).

Las cascadas de Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos (MAPK) son componentes universales de la transducción de señales de las células eucariotas, que se encuentran altamente conservadas entre organismos de diversos reinos. Estas cascadas de fosforilación de proteínas son mediadores en la transmisión intracelular y amplificación de estímulos extracelulares, dando como resultado la inducción de respuestas intracelulares altamente específicas al estímulo inicial (Ichimura *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 1998). Estas cinasas deben su nombre a que la primera MAPK que se descubrió fue ERK o pp42, una proteína propia de mamíferos que actúa al ser estimulada por mitógenos como el factor de crecimiento epidérmico, pero más tarde se demostró que también están involucradas en otros procesos fisiológicos (Rossomando *et al.*, 1989; Marshall, 1994).

La vía de MAPK da inicio cuando una molécula señal se une a un receptor de membrana, lo cual induce una serie de fosforilaciones en cascada que inicia con una MAPKKK, posteriormente una MAPKK, y finalmente una MAPK (**Fig. 9**). Esta última es capaz de fosforilar diferentes blancos, incluyendo factores de transcripción, para activar genes de respuesta. El genoma de *Arabidopsis* alberga 20 MAPK, 10 MAPKK y 80 MAPKKK (Ichimura *et al.*, 2002; Colcombet y Hirt, 2008). Típicamente, una cinasa cataliza la fosforilación del grupo hidroxilo de los residuos Ser, Thr o Tyr, por lo que de acuerdo a su especificidad de sustrato se clasifican en dos grandes grupos, las cinasas Ser/Thr y las cinasas Tyr. Las MAPKKK son cinasas de tipo Ser/Thr, mientras que las MAPKK son cinasas de doble especificidad, es decir, fosforilan tanto en el residuo Ser/Thr como Tyr. Por su parte, las MAPK son cinasas Ser/Thr capaces de fosforilar un amplio rango de sustratos, incluyendo otras cinasas o factores de transcripción (Colcombet y Hirt, 2008).

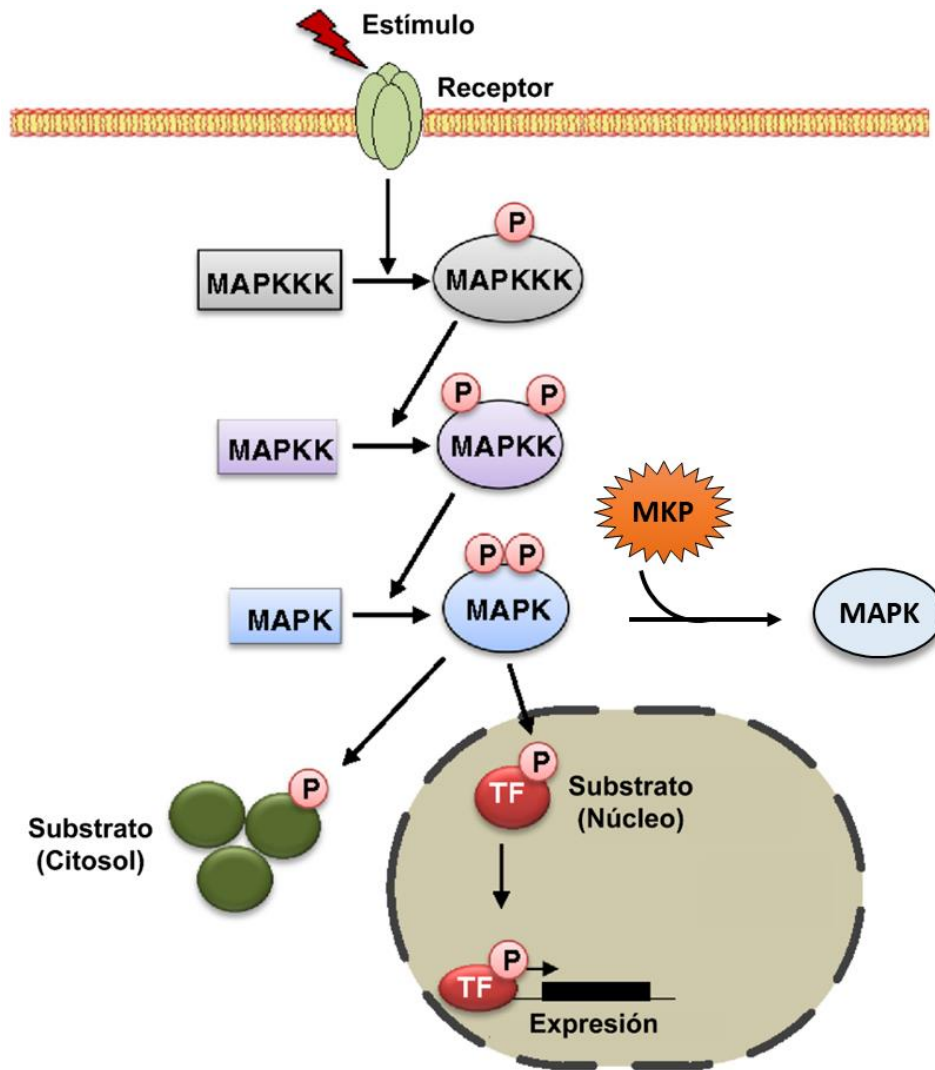


Figura 9. Vía de señalización de MAPK. Esquema general del funcionamiento de una cascada de MAPK. En círculos rosas se muestran los grupos fosfato, los cuales son removidos por fosfatasas (MKP), mostradas en color naranja. Modificado de Danquah *et al.* (2014).

Cabe recalcar que los mismos módulos de MAPK pueden ser activados por diferentes estímulos extracelulares, por lo que es importante para el organismo controlar la intensidad y la duración de la activación de MAPK, de manera que se pueda dar una respuesta correcta a las diferentes señales del ambiente.

2.7.1 Procesos vegetales regulados por MAPK

Las MAPK orquestan diversos procesos del desarrollo al regular la señalización de diversas hormonas vegetales (Xu y Zhang, 2015; Jagodzik *et al.*, 2018). Un ejemplo de esto, es la respuesta de las plantas ante el ataque de animales herbívoros, donde una de las primeras respuestas de defensa es la activación de la vía de MAPK, lo que produce una alteración en los niveles de hormonas de defensa, como el etileno, el AJ y el AS (Hettenhausen *et al.*, 2015; Petersen *et al.*, 2000; Brodersen *et al.*, 2006). Las principales MAPK encargadas de regular procesos de defensa son MPK3 y MPK6; por ejemplo, en *Arabidopsis*, el módulo MKK3-MPK6 reprime al factor transcripcional MYC2 del AJ, mientras que en *Nicotiana tabacum*, MPK3 y MPK6 inducen la biosíntesis de AJ y reprimen la acumulación de AS (Takahashi *et al.*, 2007; Gomi *et al.*, 2005).

Recientemente, Sözen *et al.* (2020) demostraron que tras una herida se activa una cascada de MAPK independiente de ácido jasmónico que involucra a MKK3, MPK1, MPK2 y MPK7, pero que esta activación ocurre de manera más lenta que la del módulo MPK6-MPK3. También se les ha vinculado con las citocininas, el ABA y los brassinoesteroides (Smith *et al.*, 1999; Jagodzik *et al.*, 2018; Xu y Zhang, 2015).

2.8 Regulación negativa de la vía MAPK

Una vez iniciadas las cascadas de señalización, estas también necesitan ser atenuadas para evitar la sobre-activación y para reiniciar el sistema a sus niveles basales después del estímulo. La desactivación de las cascadas de MAPK se lleva a cabo mediante la defosforilación de los residuos de Thr y Tyr en el motivo de activación. Las MAPK fosfatasas (MKP) hidrolizan los grupos fosfato de las proteínas, por lo cual son importantes reguladores negativos en la señalización de las MAPK (Bartels *et al.*, 2010).

Existen tres grandes familias de fosfatasas: las Fosfoproteínas Fosfatasas (PPP) y las Proteínas Fosfatasas Dependientes de Metales (PPM) defosforilan en residuos Ser/Thr, mientras que las Tirosina Fosfatasas (PTP), como su nombre lo indica, defosforilan los residuos Tyr. Estas últimas incluyen también a las Fosfatasas de

Doble Especificidad (DSP), que son capaces de defosforilar ambos residuos. Algunos miembros representativos de la familia PPP son las fosfatasa PP1, PP2A, PP2B, PP4, PP5, PP6 y PP7, y la familia PPM incluye a las PP2C (Shi, 2009). Estas fosfatasa juegan un papel importante en la señalización y respuesta de defensa asociada a patógenos, controlando la actividad MAPK (Singh *et al.*, 2016). Por otro lado, las DSP, incluidas dentro de la familia PTP, están involucradas en diversos procesos de desarrollo y de respuesta a estrés ambiental, como salinidad, sequía, radiación UV-B, así como ante el ataque de patógenos (Ulm *et al.* 2001, 2002; Luan, 2003; Bartels *et al.*, 2009).

Se han identificado 23 DSP en el genoma de *Arabidopsis*, de los cuales al menos cinco son capaces de defosforilar a las MAPK, por lo que se las ha denominado MKP (Kerk *et al.*, 2008; Bartels *et al.*, 2010). Estas cinco MKP son: DUAL-SPECIFICITY PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE 1 (DsPTP1), MAP KINASE PHOSPHATASE 1 (MKP1), MAP KINASE PHOSPHATASE 2 (MKP2), INDOLE-3-BUTYRIC ACID RESPONSE 5 (IBR5), y PROPYAZAMIDE HYPERSENSITIVE 1 (PHS1).

2.8.1 El papel de MKP1

Entre estas cinco DSP, MKP1 es por mucho la más estudiada, puesto que interacciona con varias MAPK y por su papel en la respuesta hacia diferentes tipos de estímulos ambientales, ya sean bióticos o abióticos. MKP1 fue la primera fosfatasa que se descubrió del grupo de las DSP y fue originalmente identificada como un gen inducido por daño oxidativo y como una fosfatasa específica de ERK (Li *et al.*, 2003). Entre las MAPK que defosforila, se encuentran MPK3, MPK4 y MPK6, pero es con esta última con la que tiene una interacción más fuerte (Ulm *et al.*, 2002; Bartels *et al.*, 2010); además, se sugiere que existe un mecanismo de retroalimentación en el que MPK6 y MKP1 regulan la actividad una de la otra (Jiang *et al.*, 2018).

MKP1 participa en la remodelación de la arquitectura radicular en respuesta a diferentes estímulos en *Arabidopsis* (López-Bucio *et al.*, 2014) y regula

negativamente las vías del ácido jasmónico y etileno en plantas de *Nicotiana tabacum*, pues se observó que en la mutante *mkp1* se incrementa la producción de ambas fitohormonas en respuesta a heridas (Oka *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2018).

Las mutantes deficientes de MKP1 son hipersensibles al estrés por radiación UV-B, lo cual está asociado con una inactividad reducida de MPK3 y MPK6 (González-Besteiro y Ulm, 2013). Los autores de dicho trabajo demostraron que la cascada de MAPK se activa en respuesta a este estrés al recibir la señal de los dímeros de pirimidina. Asimismo, demostraron que la hipersensibilidad en la mutante *mkp1* está asociada con una reducción en la expresión de *CYCB1;1*, pues MKP1 es un regulador positivo de dicho gen y juega un papel principal en el tejido aéreo de *Arabidopsis* en respuesta a la radiación UV-B.

Tamnanloo *et al.* (2018) demostraron que MKP1 actúa como un regulador específico de la vía MAPK, desfosforilando a MPK3 y MPK6 para controlar la diferenciación de las células de linaje estomatal y el destino de estas células. Observaron que en la mutante deficiente de MKP1 las células precursoras de los estomas no llegan a diferenciarse como tal, y que este gen se expresa principalmente en las células de la epidermis, lo cual demuestra que promueve la diferenciación celular en las etapas iniciales del desarrollo de los estomas.

2.8.2 Regulación de ERO por MAPK y fosfatasas

Existen estudios que demuestran que las ERO pueden inducir la activación de la cascada de MAPK, pues constituyen una clase importante de moléculas señal que median la respuesta a diferentes estímulos ambientales y procesos celulares y fisiológicos (Apel y Hirt, 2004). El H₂O₂ es la principal ERO que funciona como molécula señal, que en *Arabidopsis* activa a varias MAPK, como MPK1, MPK2, MPK4, MPK7, MPK3 y MPK6 (Ortiz-Masia *et al.*, 2008; Nakagami *et al.*, 2006; Doczi *et al.*, 2007; Liu y He, 2017).

El H₂O₂ también activa a ANP1, una MAPKKK específica de *Arabidopsis*, la cual da inicio a una cascada de señalización que involucra a MPK3 y MPK6 y además bloquea la actividad auxínica. MKK3 es una MAPKK también involucrada en la

homeostasis de ERO en *Arabidopsis* (Takahashi *et al.*, 2011). Se ha demostrado que el H₂O₂ activa la vía de MAPK y genes del ciclo celular durante la emergencia de raíces adventicias y laterales, respectivamente (Pan *et al.*, 2012). Por su lado, la exposición a ozono (O₃) provoca la activación de MPK6 y MPK3, de manera independiente a la señalización de etileno y ácido jasmónico, mientras que la completa activación de MPK3 necesita de la señalización del AS (Kovtun *et al.*, 2000).

También existe evidencia que indica que el módulo MPK6-MKP1 regula el cierre estomático en respuesta a la radiación UV-B, donde MPK6 actúa como un regulador positivo de este proceso, actuando cascada arriba de la producción de óxido nítrico en las células guardianas y cascada abajo de la producción de H₂O₂; por su parte, MKP1 funciona como regulador negativo en la respuesta a UV-B en las células guardianas, regulando negativamente a MPK6 (Li *et al.*, 2017). Por otro lado, el H₂O₂ también es capaz de inactivar a la fosfatasa PTP1 en *Arabidopsis*, regulador negativo de MPK6. Otras fosfatasas involucradas en la señalización de ABA dentro de las células guardianas se modulan *in vitro* por el H₂O₂ (Gupta y Luan, 2003; Meinhard y Grill, 2001).

En un trabajo reciente, Escudero *et al.* (2019), mostraron que MKP1 es un mediador de la respuesta inmune hacia Patrones Moleculares Asociados a Microbios (MAMP, por sus siglas en inglés), pues observaron en mutantes *mkp1* una incrementada respuesta a MAMP, como una mayor producción de ERO y, por lo tanto, una mejor y más rápida resistencia hacia enfermedades. Esta mayor producción de ERO en las mutantes, deja entrever que MKP1 regula negativamente la producción de ERO (**Fig. 10A,B**). Además observaron que esto se debe a que MKP1 regula negativamente la actividad de RBOHD, que codifica para una NADPH oxidasa, pues los niveles de ERO en tratamientos con MAMP se vieron incrementados en mutantes *mkp1* que expresaban de manera constitutiva a RBOHD (*35S:RBOHD mkp1*) (**Fig. 10C,D**). Más tarde, en un estudio elaborado por Zhao *et al.* (2020), se propuso a MKP1, junto con la fosfatasa PTP1, como reguladores negativos de la

producción de H_2O_2 , interactuando también con el módulo MPK3-MPK6 bajo tratamientos con toxinas del patógeno *Verticillium dahliae*.

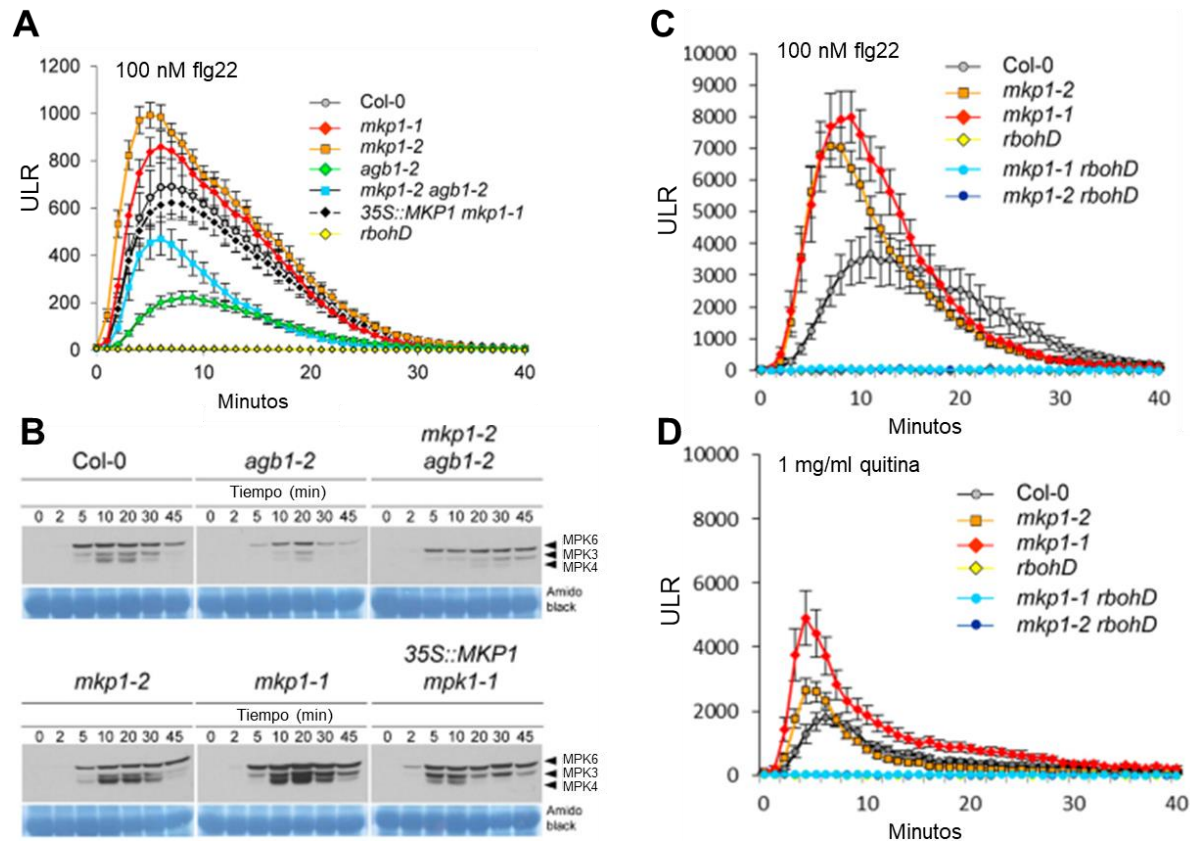


Figura 10. MKP1 regula la producción de ERO ante respuestas inmunes. A) Producción de H_2O_2 ante tratamientos con flg22 en mutantes *mkp1*. B) Ensayo de fosforilación donde se muestra la sobre activación de MPK3, MPK4 y MPK6 con flg22. C) Producción de H_2O_2 , donde se muestra como la sobre producción en *mkp1* es dependiente de RBOHD, con tratamientos con flg22 y D) quitina. Modificado de Escudero *et al.* (2019).

Aun no se tienen muy claros los mecanismos de activación, ni los blancos que son activados cascada abajo por las MAPK después de ser inducidas por ERO, pero tal parece que dicha activación es pieza clave para mediar la respuesta celular a un sinfín de estímulos de estrés ambiental. Toda esta evidencia del papel de MKP1 como un regulador en la producción y señalización de ERO nos puede dar indicios del mecanismo por el cual esta fosfatasa actúa también regulando la respuesta a la serotonina. Por lo tanto, es de gran relevancia resaltar la participación de MKP1 en

la regulación negativa de la interacción de varias vías de señalización en plantas, incluyendo la respuesta a serotonina, y es pertinente dilucidar los mecanismos por los que actúa esta fosfatasa para orquestar dichas vías.

3. JUSTIFICACIÓN

La serotonina es una molécula bioactiva que influencia el crecimiento y desarrollo de la raíz actuando a través de la señalización por ácido jasmónico y etileno. La fosfatasa MKP1 modula de manera negativa programas de desarrollo y defensa ante estrés biótico y abiótico, mediados por MAPK. Se desconoce si la vía de MAPK participa en la respuesta de la raíz a serotonina, por lo que es importante dilucidar el posible papel de la fosfatasa MKP1 en dicho mecanismo de señalización.

4. HIPÓTESIS

La serotonina regula el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*, a través de la fosfatasa MKP1 y la señalización de MAPK.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la participación de la fosfatasa MKP1 y elementos regulados por la cascada MAPK en la respuesta de la raíz de *Arabidopsis thaliana* a serotonina.

5.2 Objetivos particulares

- Analizar la participación de la fosfatasa MKP1 en la morfogénesis de la raíz de *A. thaliana* en respuesta a serotonina.
- Determinar qué componentes de la vía de señalización del ácido jasmónico son mediadores en la respuesta a serotonina.
- Analizar el papel de MKP1 en la señalización de ERO en respuesta a serotonina.

6. METODOLOGÍA

6.1 Material biológico y condiciones de crecimiento

Se utilizaron semillas silvestres de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col-0) y mutantes de la vía de MAPK, como la *mpk6* (Liu y Zhang, 2004) y la fosfatasa *mkp1* (Ulm *et al.*, 2002), además de la sobre-expresora 35S:MPK6 y la doble mutante *mkp1/mpk6* (Anderson *et al.*, 2011). También se utilizaron algunas líneas transgénicas como: el marcador de división celular *CycB1::GUS* (Colón-Carmona *et al.*, 1999), reporteras de algunos genes de la vía de señalización del ácido jasmónico, como *JAZ1::JAZ1::GFP* (Grunewald *et al.*, 2009), *JAZ10::JAZ10::GFP* (Pillitteri *et al.*, 2011) y *pLOX2::GUS* (Jensen *et al.*, 2002), así como un biosensor específico para H₂O₂, *35S::HyPer::YFP* (Hernández-Barrera *et al.*, 2013).

Las semillas se desinfectaron con etanol al 96% (v/v) durante 4 minutos y con cloro al 20% por 5 minutos, posteriormente se realizaron 5 enjuagues con agua desionizada estéril y se incubaron por 48 horas a 5°C para romper la dormancia. Las semillas se germinaron y crecieron en cajas Petri con medio de cultivo MS 0.2X (Murashige y Skoog, 1962), el cual contiene una formulación de sales MS 0.9 g/L y sacarosa 6 g/L, y se realizó un ajuste a pH 7 para posteriormente añadirse fitoagar 10 g/L. Dichas placas fueron colocadas en posición vertical en una cámara de crecimiento para plantas con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a una intensidad de luz de 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y a 22°C de temperatura.

Una vez alcanzados los 4 días después de la germinación, las plántulas se transfirieron a cajas Petri que contenían medio de cultivo MS 0.2X adicionado con diferentes tratamientos de serotonina y compuestos relacionados con las vías de señalización involucradas, así como un antioxidante para intentar revertir el efecto de la serotonina, el resveratrol. Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado.

6.2 Obtención de cruzas

Para evaluar la participación de MKP1 en distintos procesos asociados a la respuesta a serotonina, se movilizaron al fondo genético *mkp1* los marcadores

CycB1::GUS, *JAZ1::JAZ1:GFP*, *JAZ10::JAZ10:GFP*, *LOX2::GUS* y *35S::HyPer::YFP* mediante cruces. Estas se realizaron utilizando a las plantas mutantes como receptoras del polen de las plantas transgénicas. En la mutante se seleccionaron flores inmaduras que apenas comenzaran a abrirse y, con ayuda de pinzas de disección, se descubrieron sus estigmas y se polinizaron, haciendo contacto con las anteras de las flores donadoras del polen, es decir, de las plantas transgénicas. La silicua desarrollada a partir de la flor polinizada artificialmente dio lugar a la primera generación hija, es decir, la Filial 1 (F1). Las semillas F1 fueron sembradas y crecidas en medio MS 0.2X, hasta alcanzar un tamaño que nos permitiera seleccionar aquellas con fenotipo silvestre. Dichas plantas fueron crecidas hasta producir semillas con su propia autopolinización de manera natural, a las que denominamos Filial 2 (F2). Nuevamente, dichas semillas fueron germinadas y crecidas para seleccionar aquellas plántulas que, en esta ocasión, dieran fenotipo mutante. Estas plántulas fueron crecidas hasta producir semillas de la F3, donde el 100% de ellas son fenotipo mutante ya con el marcador transgénico. Los lotes de la F3 fueron revisados para comprobar que fueran líneas homocigotas y la presencia de las proteínas reporteras; una vez comprobado esto, se procedió con los experimentos pertinentes.

6.3 Análisis histoquímico de la actividad GUS

Para conocer cómo actúan ciertas proteínas *in vivo* en respuesta a los tratamientos utilizados, se utilizaron líneas reporteras que contengan el gen de interés unido a los marcadores *GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP)* o β -glucuronidasa (*GUS*), y dicha actividad se observó mediante microscopía confocal o de Nomarsky, respectivamente.

Las plantas transgénicas con el gen reportero *GUS* se colocaron en cajas de microtítulos con 300 μ l de X-Gluc al 0.1% (5-bromo-4-cloro-3-indolil, β -D-glucoronido) en amortiguador de fosfatos (NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 , 0.1M, pH7) con 2 mM ferrocianuro de potasio y 2 mM ferricianuro de potasio, durante 14 horas a 37°C. Pasado el periodo de incubación, se retiró la solución X-Gluc y las plantas fueron clarificadas con una solución de HCL 0.24 N en metanol al 20% (v/v) durante 45

minutos a 62°C. La solución fue removida y se agregó NaOH al 7% (v/v) en etanol al 60% (v/v) por 20 minutos a temperatura ambiente. Nuevamente se retiró la solución y el tejido fue hidratado con tratamientos de etanol al 40, 20 y 10% (v/v) por 20 minutos cada uno. Después de haberse retirado el último tratamiento con etanol, se adicionó glicerol al 50% (v/v) para ser colocadas en un portaobjetos y su posterior análisis en un microscopio de contraste (Nomarsky) Leica DM 5500 B.

6.4 Análisis del desarrollo vegetal

Para evaluar el crecimiento de la raíz primaria, se cuantificó su longitud con una regla, en una muestra de al menos 12 plantas de 3 placas independientes, así como el número de raíces laterales y adventicias. Se utilizó un microscopio estereoscópico (Leica MZ6) para el conteo de raíces, así como para observar y fotografiar las zonas de crecimiento.

6.5 Detección de especies reactivas de oxígeno

Las ERO totales se detectaron mediante una tinción con 10 μ M de diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (H₂DCFDA), un compuesto no fluorescente que se difunde pasivamente a través de las membranas celulares y al ser desesterificado intracelularmente, se convierte en 2',7'-diclorofluoresceína, que es altamente fluorescente tras la oxidación. Las plántulas se sumergieron en el reactivo durante una hora en total oscuridad, para después ser enjuagadas tres veces con solución buffer durante 20 minutos. Las plantas se observaron y fotografiaron con un microscopio confocal Olympus FV-100, la fluorescencia indicando las ERO totales fue cuantificada mediante el programa ImageJ 1.51 n, eligiendo una misma área. La fluorescencia relativa se presentó como unidades arbitrarias (U. A. = escala de grises de píxeles/ μ m²), que representa el número de píxeles del color fluorescente.

Para el caso de la producción de H₂O₂, hicimos uso de la línea reportera 35S:HyPer::YFP, la cual reporta de manera selectiva los niveles de H₂O₂. Esta consiste en el dominio regulatorio del factor de transcripción OxyR (OxyR-RD) de *Escherichia coli*, insertado en YFP permutada circularmente. En presencia de H₂O₂, el OxyR-RD se le une selectivamente y sufre un cambio conformacional significativo

debido a la formación de un enlace disulfuro intramolecular entre dos residuos de cisteína (Choi *et al.*, 2012).

6.6 Tinción con yoduro de propidio y microscopía confocal

Las plantas transgénicas con los genes reporteros *JAZ1::JAZ1:GFP* y *JAZ10::JAZ10:GFP*, así como *35S:HyPer::YFP*, fueron teñidas con yoduro de propidio al 0.1% (v/v) para su análisis en un microscopio confocal Olympus FV-100.

6.7 Análisis estadístico

Se utilizó el programa STATISTICA 8.0 para el análisis estadístico de los datos obtenidos en cada uno de los experimentos; dichos datos fueron sometidos a un análisis ANOVA de una sola vía y pruebas de significancia de Tukey con una $P \leq 0.05$, para conocer las diferencias significativas en las respuestas de crecimiento de la raíz. En cada gráfica se indicó con letras distintas la media de los datos que difieran significativamente. Asimismo, algunos de los análisis fueron sometidos a una prueba de χ^2 seguida de análisis de proporciones con $P \leq 0.05$, indicando con un asterisco las diferencias significativas.

7. RESULTADOS

7.1 La serotonina afecta el crecimiento de la raíz de *Arabidopsis* a través de la fosfatasa MKP1

Las fosfatasas, al ser reguladores de la vía de MAPK, modulan diversos programas de desarrollo e inmunidad vegetal (Ulm *et al.*, 2002; Bartels *et al.*, 2010). MKP1 participan en la respuesta de la raíz a los aminoácidos L-Glu y L-Trp (Ravelo-Ortega *et al.*, 2021; García-Valle, 2019). Este último es de gran relevancia para el crecimiento vegetal, pues es precursor de importantes metabolitos como las auxinas y la serotonina. Para conocer el posible papel de MKP1 en el efecto de la serotonina sobre la raíz de *Arabidopsis* se crecieron plantas del ecotipo Col-0 y las mutantes *mkp1* en medio MS 0.2X, y cuatro días después de la germinación se transfirieron a medios suplementados con diferentes concentraciones de serotonina, donde continuaron su crecimiento siete días más y se analizó la arquitectura radicular. Fue en la concentración de 150 μ M de serotonina donde se observó que el crecimiento de la raíz primaria de las plantas normales disminuyó un 60%, mientras que en la mutante se vio resistencia, creciendo prácticamente igual que las plantas normales en medio sin el compuesto. Es a partir de 200 μ M del compuesto donde ya hubo una inhibición del 50% en el crecimiento de la raíz primaria de las mutantes, con una represión aún mayor en 250 μ M de serotonina (**Fig. 11A**).

Los resultados anteriores indican que la serotonina no afecta la viabilidad de las plantas, pues aún en altas concentraciones, no se afectó la formación del follaje. Por otra parte, se requiere de la fosfatasa MKP1 para que exista una respuesta a la indolamina en el crecimiento de la raíz primaria, ya que en las mutantes *mkp1* existe una menor sensibilidad al compuesto.

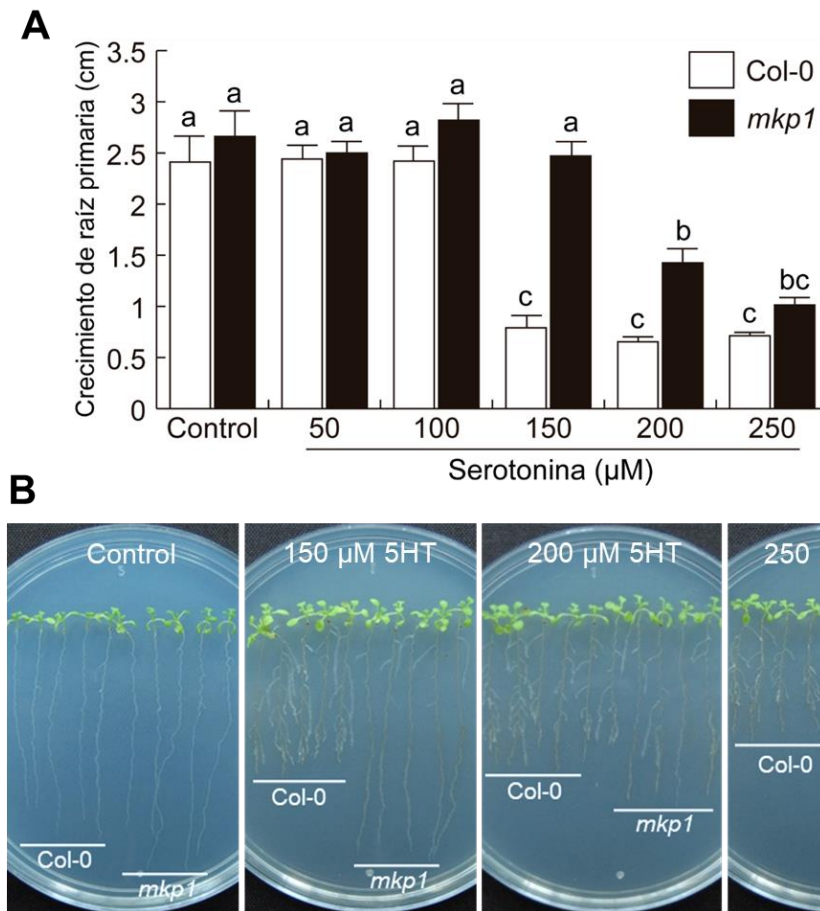


Figura 11. Efecto de la serotonina sobre el crecimiento de plantas Col-0 y mutantes *mpk1*. Las plantas fueron germinadas en medio MS 0.2X y transferidas al cuarto día después de la germinación a medios suplementados con diferentes concentraciones de serotonina. El crecimiento se registró al séptimo día después de la transferencia. A) Gráfica del crecimiento de la raíz primaria de las plantas tratadas control y con las concentraciones indicadas de serotonina. Los datos muestran la media $\pm$ desviación estándar (n=15). Las letras indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en una prueba estadística de Tukey. B) Fotos representativas de las concentraciones donde se observan cambios significativos, es decir, 150, 200 y 250 µM de serotonina.

7.2 MPK6 está involucrada en la respuesta a serotonina, mediada por MKP1

Debido a la interacción ya reportada entre MKP1 y la cinasa MPK6 sobre el desarrollo vegetal (Bartels *et al.*, 2010), fue de nuestro interés conocer si dicho modulo participa en la respuesta de la raíz de *Arabidopsis* a serotonina. Para esto, se utilizaron plántulas Col-0 y *mpk6* de cuatro días de edad, las cuales fueron transferidas a medios suplementados con serotonina en los que crecieron durante siete días. En este caso se observó que en las tres concentraciones que se

probaron, las mutantes *mpk6* presentaron la misma inhibición en el crecimiento de la raíz primaria que las plantas normales (**Fig. 12**), lo cual sugiere que la pérdida de MPK6 no afecta en la respuesta a serotonina. Sin embargo, para corroborarlo se utilizó la doble mutante *mkp1mpk6* transferida a tratamientos con serotonina, y vimos que manifestó la misma inhibición en el crecimiento de la raíz que las plantas normales en las tres concentraciones utilizadas (**Fig. 13**). Lo anterior sugiere que MPK6 actúa en conjunto con MKP1 para regular la señalización de la serotonina, responsable de la represión del crecimiento de la raíz primaria.

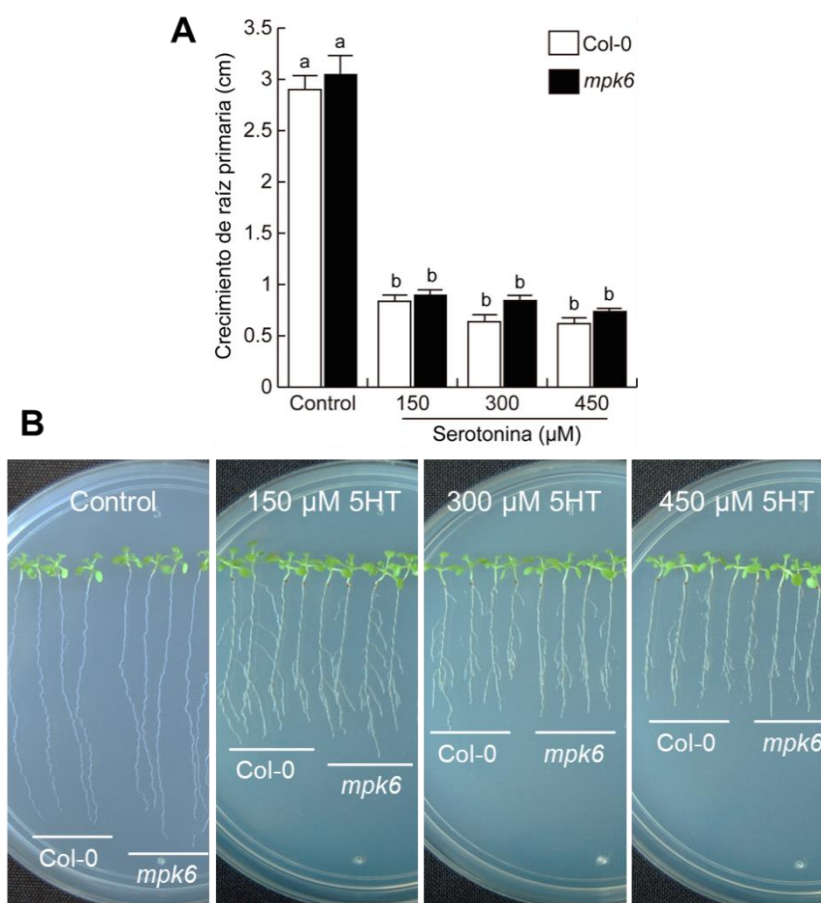


Figura 12. Efecto de la serotonina en plantas Col-0 y mutantes *mpk6*. Las plantas fueron germinadas en medio MS 0.2X y transferidas a diferentes concentraciones de serotonina, cuatro días después de la germinación. A) Gráfica del crecimiento de la RP en las plantas tratadas con y sin serotonina. Los datos muestran la media $\pm$ desviación estándar (n=15). Las letras indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en una prueba estadística de Tukey. B) Fotos representativas de plantas Col-0 y *mpk6* ante tratamientos con serotonina.

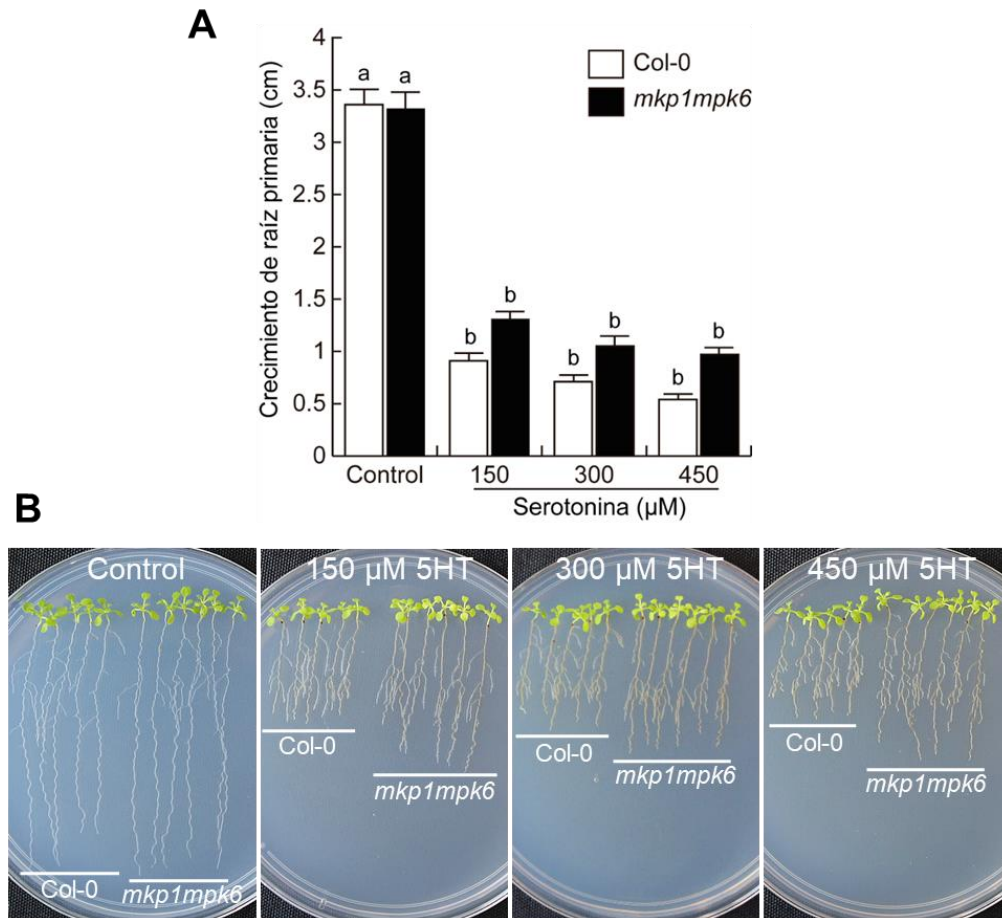


Figura 13. Efecto de la serotonina sobre plantas Col-0 y la doble mutante *mkp1mpk6*. Las plantas fueron germinadas en medio MS 0.2X y transferidas al cuarto día después de la germinación a medios sin y con diferentes concentraciones de serotonina. El crecimiento se registró al séptimo día. A) Crecimiento de la raíz primaria de las plantas tratadas con y sin serotonina. Los datos muestran la media $\pm$ desviación estándar ($n=15$). Las letras indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en una prueba estadística de Tukey. B) Fotos representativas del efecto de la serotonina sobre Col-0 y *mkp1mpk6*.

Esta última posibilidad se analizó con la comparación del crecimiento de plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan MPK6. En la línea sobre expresora de este gen, *35S:MPK6*, se obtuvo una resistencia al compuesto, inclusive en concentraciones mayores a las observadas para *mkp1*. Con base en lo anterior se extendió la curva de concentraciones, partiendo desde 100 hasta 450 μM (**Fig. 14**). En la concentración de 150 μM , donde la serotonina inhibió el 50% del crecimiento de Col-0, es donde *mkp1* tuvo el mayor grado de resistencia ante el compuesto, pero comenzaba a bajar gradualmente a partir de 200 μM , en tanto que en el caso de

35S:MPK6, también hubo resistencia al efecto de la serotonina y dicha resistencia perduró hasta 200 μ M. En 250 μ M, la raíz de *35S:MPK6* ya se vio afectada significativamente, pero aún conservaba resistencia, pues creció el doble que *mkp1*. En concentraciones altas, como 300 μ M, el crecimiento de la raíz en la sobre expresora ya se inhibió un 50% respecto a su control, sin embargo, continuó siendo resistente comparado con los otros fondos genéticos. Es en la concentración de 450 μ M donde ya se pudo observar que la raíz es completamente susceptible al efecto de la serotonina y comparable en longitud con Col-0 y *mkp1*. Este efecto en las plantas transgénicas *35S:MPK6* demuestra cómo la actividad de MPK6 y MKP1 están íntimamente relacionadas y que MPK6 está actuando en regular negativamente la respuesta a serotonina. Esto explica por qué la sobre expresora de MPK6 y la mutante *mkp1* tienen fenotipos similares, pues ambos tienen una sobre activación de MPK6, la cual bloquea la respuesta a serotonina, y, dado que la *35S:MPK6* tiene una expresión constitutiva de MPK6, la resistencia al compuesto se ve magnificada.

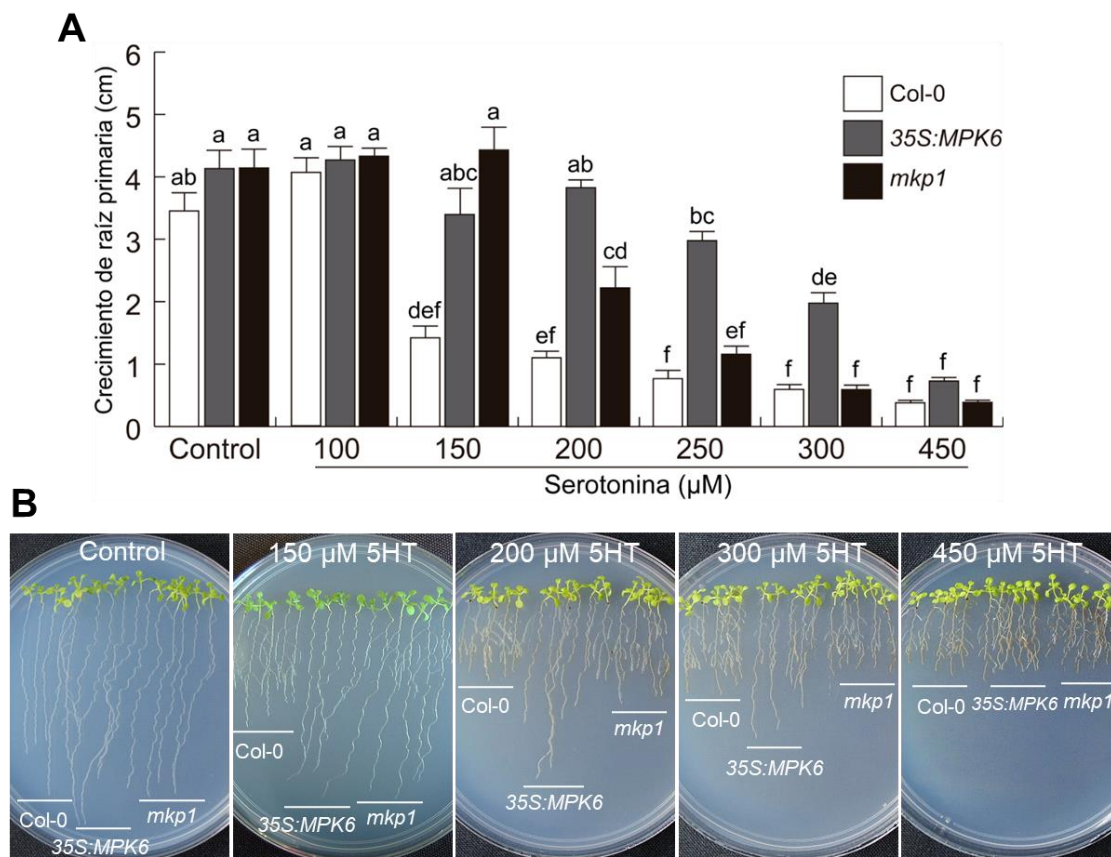


Figura 14. Comparación del efecto de la serotonina sobre la mutante *mkp1* y la línea sobre expresora 35S:MPK6. Las plantas fueron germinadas en medio MS 0.2X y transferidas al cuarto día después de la germinación a medios suplementados sin y con diferentes concentraciones de serotonina. El crecimiento se registró al séptimo día. A) Crecimiento de la raíz primaria de las plantas tratadas con y sin serotonina. Las letras indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en una prueba estadística de Tukey. B) Fotos representativas de la curva de crecimiento en Col-0, *mkp1* y 35S:MPK6, afectadas por serotonina. Los datos muestran la media $\pm$ desviación estándar (n=15).

7.3 La serotonina regula procesos celulares de división, elongación y diferenciación, de manera dependiente de MKP1

La serotonina ocasiona una inhibición en el crecimiento de la raíz primaria, debido a que afecta los procesos de división, elongación y diferenciación celular, pues son estos procesos los que determinan si la raíz primaria continua su crecimiento indefinido (Wan *et al.*, 2018b). Por esto, fue de nuestro interés conocer si la regulación de dichos procesos celulares por la serotonina, son mediados por la fosfatasa MKP1. Para conocer si la serotonina afectaba el tamaño del meristemo de plantas Col-0 y *mkp1*, se realizaron mediciones de la zona meristemática en plantas con y sin serotonina, abarcando desde el centro quiescente hasta donde se encontraba la primera célula en elongación. Este proceso se realizó en una cinética de 1, 4 y 7 días de exposición al compuesto, para conocer si este efecto ocurría de manera dependiente del tiempo de exposición. En las plantas normales, se observó que la serotonina (150 μ M), comenzó a reducir el tamaño del meristemo desde el primer día después de la transferencia, sin embargo, no es hasta el día cuatro cuando ya hubo una disminución significativa del tamaño del meristemo, con hasta un 50% menor que su tamaño normal. En el séptimo día, la serotonina indujo un drástico acortamiento en el tamaño del meristemo, bajando hasta un 75% el tamaño de su condición control. En cambio, en el caso de la mutante *mkp1*, se observó que el tamaño de la zona meristemática no se vio reducido, pues se mantuvo significativamente igual a sus condiciones control conforme va avanzando el tiempo de tratamiento, lo cual concuerda con la resistencia a la serotonina observada en el crecimiento de la raíz primaria (**Fig. 15A**).

Otro efecto notorio que produjo la serotonina fue el comienzo prematuro de la diferenciación celular, pues junto con el acortamiento del meristemo, también

comenzó la aparición de pelos radiculares justo después de la zona meristemática, antes de que las células comenzaran el proceso de elongación. Para cuantificar esto, se realizaron mediciones desde el final del meristemo, hasta la aparición del primer pelo radicular. Aquí se pudo ver que en las plantas Col-0 tratadas con serotonina, desde el primer día de tratamiento comenzaron a aparecer pelos radiculares, lo cual iba en aumento conforme avanzaba el tiempo de exposición al compuesto, hasta que en el séptimo día la separación de la zona meristemática con la zona de diferenciación ya fue prácticamente nula. Por otro lado, en el caso de *mkp1*, también comenzó un proceso de diferenciación adelantado en comparación con su control, pero este se encontraba menos marcado que en las plantas Col-0. Para el día siete, la aparición de la diferenciación en *mkp1* se mantuvo a la misma distancia que en sus tratamientos control, mostrando una clara resistencia a la serotonina (**Fig. 15B**).

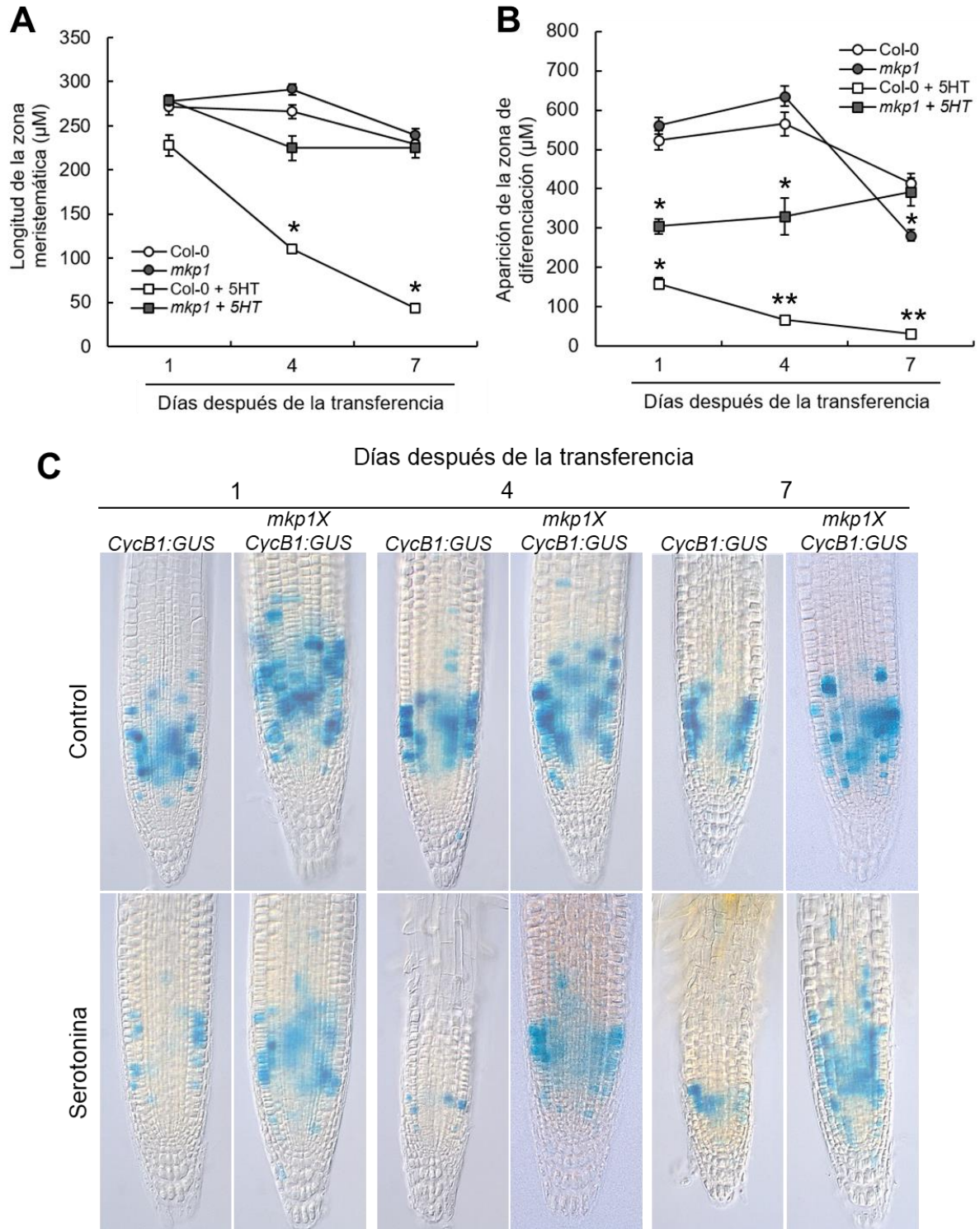


Figura 15. Efecto de la serotonina sobre la división, diferenciación y expresión de *CycB1*. Las plantas transgénicas *CycB1:GUS* y *mkp1XCycB1:GUS* fueron germinadas en medio MS 0.2X y transferidas a medios sin y con 150 µM serotonina, cuatro días después de su germinación. Siete días después de la transferencia, se registraron los resultados. A) Tamaño de la zona meristemática en respuesta a la serotonina al día 1, 4 y 7 después de

la transferencia. B) Distancia entre la zona meristemática y la aparición de pelos radiculares en respuesta a serotonina, a tres tiempos después de la transferencia. El asterisco indica una diferencia significativa en una prueba de χ^2 seguida de análisis de proporciones $P \leq 0.05$; el doble asterisco cuando $P \leq 0.01$ ($n=12$). C) Fotografías representativas del efecto de la serotonina en la punta de la RP, así como en la expresión de *CycB1:GUS*. Las plantas fueron procesadas 7 días después de la transferencia para determinar la actividad de la β -glucuronidasa y clarificadas para mostrar la expresión del gen.

También fue de nuestro interés conocer cómo afecta la serotonina a la actividad mitótica, en vista de que el tamaño del meristemo se ve reducido y con un avanzado proceso de diferenciación. Para ello, se utilizó la construcción genética *CycB1:GUS*, la cual contiene el promotor de un gen que se expresa entre la fase G2 a M del ciclo celular, fusionado al gen reportero *GUS*. Este gen codifica para la β -glucuronidasa, cuya actividad bioquímica se manifiesta con la aparición de un precipitado azul en las células que lo expresan, indicativo de actividad mitótica. En las plantas normales, la serotonina redujo drásticamente la actividad mitótica desde el primer día, efecto que se vio aún más marcado en los días 4 y 7 posteriores a la transferencia. Además, se movilizó mediante cruces al marcador *CycB1:GUS* al fondo mutante *mkp1* para analizar también su actividad mitótica. En estas se observó que *mkp1* mantuvo una actividad mitótica muy similar en todos los tratamientos, es decir, también mostró resistencia a la disminución de la división celular causado por la serotonina (**Fig. 15C**).

Para conocer si la zona de elongación también se veía afectada por los tratamientos, se realizaron mediciones desde el final de la zona de transición, hasta la primera célula completamente elongada. Asimismo, se hicieron mediciones de las primeras tres células de esta zona, para caracterizar de mejor manera los cambios que provoca la serotonina en este proceso celular, tomando como la primera célula aquella que ya estaba completamente elongada (**Fig. 16A**). En las plantas normales, se observó que al igual que ocurría en las zonas anteriores, la zona de elongación también se vio afectada por la serotonina, reduciendo su tamaño de manera significativa a partir del cuarto día de tratamiento, dicho tamaño se mantuvo igual hasta el séptimo día. En el caso de la mutante *mkp1*, presentó una zona de elongación más larga que las plantas Col-0 en su condición control, la cual fue alcanzando un tamaño comparable conforme avanzaban los días y se iban

diferenciando las células. Sin embargo, en las plantas tratadas con serotonina, hubo una reducción en el tamaño de esta zona al primer día después de la transferencia, pero ese tamaño se mantuvo igual conforme avanzaron los días del tratamiento. Esto pudo deberse al estrés causado por la transferencia y la percepción del compuesto en el medio de cultivo, pero la resistencia por parte de *mkp1* a la serotonina continuó en los siguientes seis días de tratamiento (**Fig. 16B**). En cuanto al tamaño de cada una de las células, se realizaron las mediciones al séptimo día después de la transferencia, que es cuando se notó más marcada la reducción en el tamaño de dicha zona, en que las plantas normales disminuyeron su tamaño alrededor de un 50% en comparación con las plantas no tratadas con la indolamina y, como era de esperarse, en *mkp1* las células mantuvieron su mismo tamaño que en las de las condiciones control (**Fig. 16C**).

En conjunto, estos resultados muestran que la serotonina es un regulador de los procesos de división, elongación y diferenciación celular, y es mediante la modulación de estos procesos, que es capaz de afectar el crecimiento de la raíz primaria. Esta respuesta de la raíz hacia la serotonina es claramente dependiente de la fosfatasa MKP1.

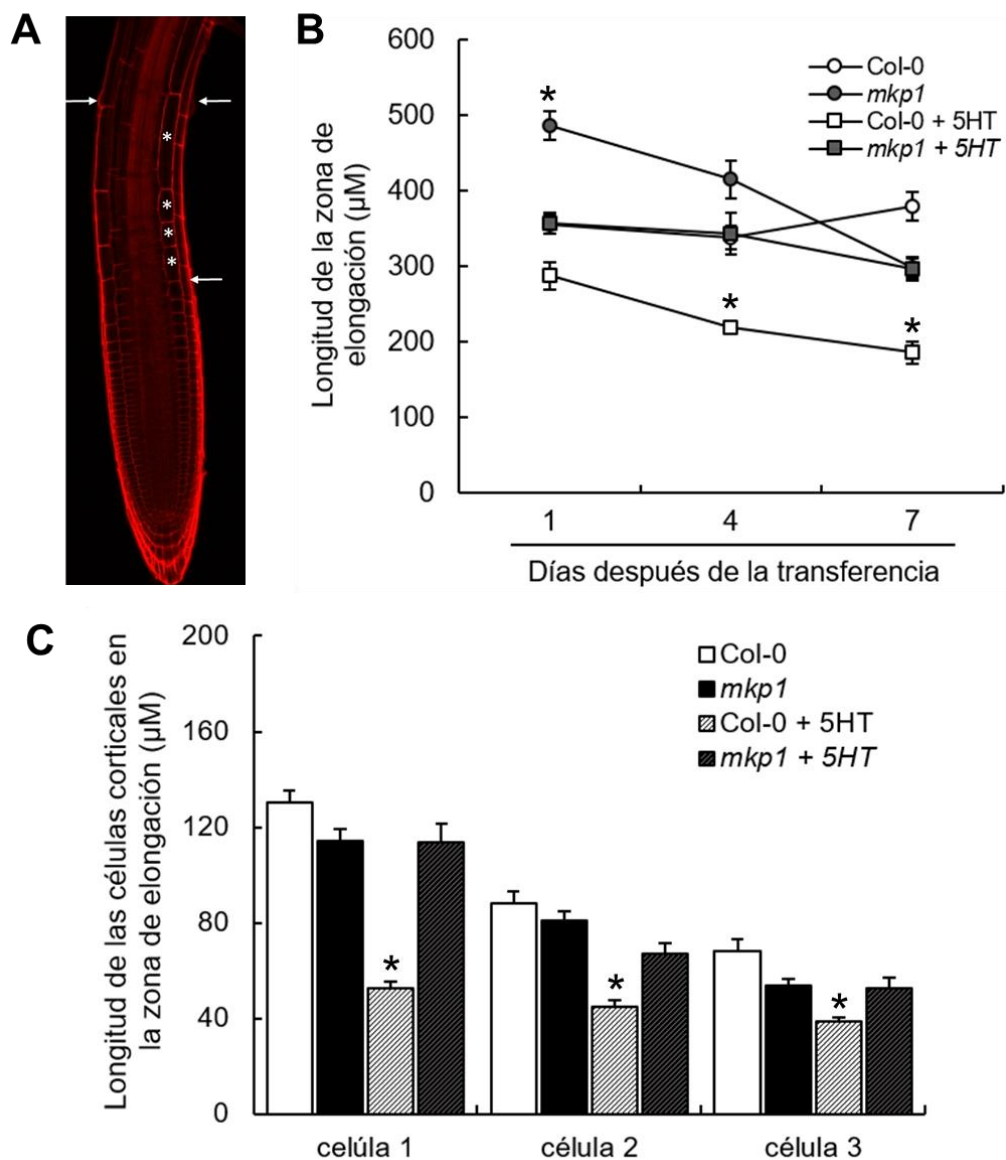


Figura 16. Efecto de la serotonina sobre la zona de elongación celular. Las plantas fueron germinadas en medio MS 0.2X y transferidas a medios sin y con 150 μM serotonina, al cuarto día después de la germinación. A) Imagen representativa de la longitud de la zona de elongación, delimitada por flechas blancas. Los asteriscos blancos muestran las células que la conforman. B) Tamaño de la ZE en respuesta a la serotonina al día 1, 4 y 7 después de la transferencia. C) Tamaño de las primeras tres células de la zona de elongación en respuesta a serotonina, al séptimo día después de la transferencia. El asterisco indica una diferencia significativa en una prueba de χ^2 seguida de análisis de proporciones $P \leq 0.05$ (n=12).

7.4 La respuesta a etileno en la raíz es independiente a MKP1

Según lo reportado por Pelagio-Flores *et al.* (2016), elementos de la vía de señalización del etileno están involucrados en la respuesta a serotonina en la raíz, por lo que fue de nuestro interés conocer si MKP1 se activa en plantas con niveles incrementados de etileno. Con esta finalidad, se crecieron plántulas normales y mutantes *mkp1* en medios con diferentes concentraciones de ACC, el precursor de la síntesis de etileno. Se encontró que la mutante *mkp1* no presentó una respuesta diferente a la de las plantas normales, pues mostró el mismo porcentaje de inhibición en la raíz primaria en los tratamientos con ACC (**Fig. 17**). Esto indica que MKP1 no es regulador de la vía del etileno, o bien que está cascada arriba de esta vía en la respuesta a serotonina.

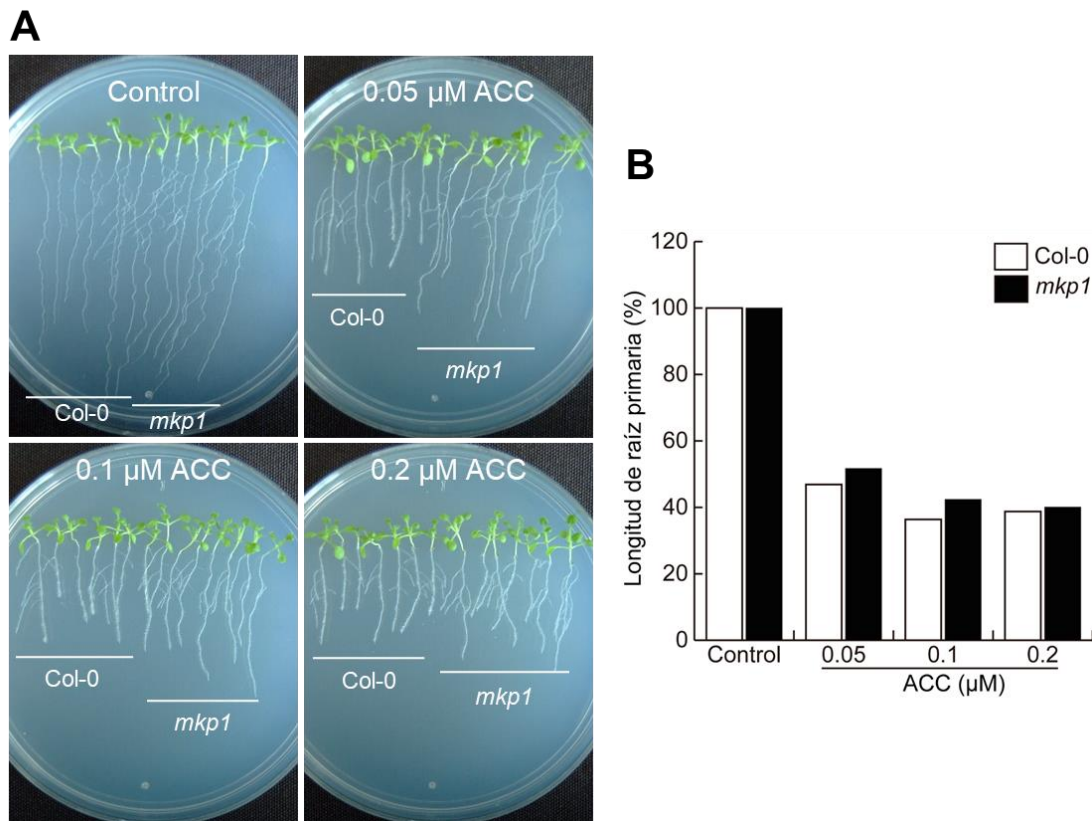


Figura 17. Efecto del ACC sobre el crecimiento de plantas Col-0 y *mkp1*. Las plantas fueron germinadas en medio MS 0.2X suplementado con diferentes concentraciones de ACC. El crecimiento se registró diez días después de la germinación. A) Fotos representativas del efecto del ACC sobre plantas Col-0 y *mkp1*. B) Crecimiento de la raíz primaria de las plantas tratadas con y sin ACC, relativo a 100 en base a los tratamientos control (n=15), analizadas con una prueba de χ^2 seguida de análisis de proporciones respecto a Col-0 ($P \leq 0.05$).

7.5 MKP1 es un mediador de la respuesta al ácido jasmónico en la raíz

La vía del ácido jasmónico es otro elemento involucrado en la respuesta de la raíz a serotonina (Pelagio-Flores *et al.*, 2016); para estudiar si MKP1 funciona como regulador de esta vía, se crecieron plantas normales y mutantes *mkp1* en diferentes concentraciones de ácido jasmónico y medimos el crecimiento de la raíz primaria. Se observó que en las plantas normales hubo una inhibición del crecimiento desde la concentración más baja (1 μ M), con un 50% aproximadamente, y en las concentraciones de 2 y 4 μ M baja hasta más de un 60%, mientras que en la mutante *mkp1* se observó una resistencia parcial al efecto del ácido jasmónico, pues si bien se redujo el crecimiento de su raíz en 1 μ M, se mantuvo igual en las concentraciones más altas, llegando a alcanzar casi el doble de tamaño que la raíz de las plantas normales (Fig. 18A,B). Esta resistencia por parte de *mkp1*, corrobora el papel de la fosfatasa como regulador de la respuesta al ácido jasmónico.

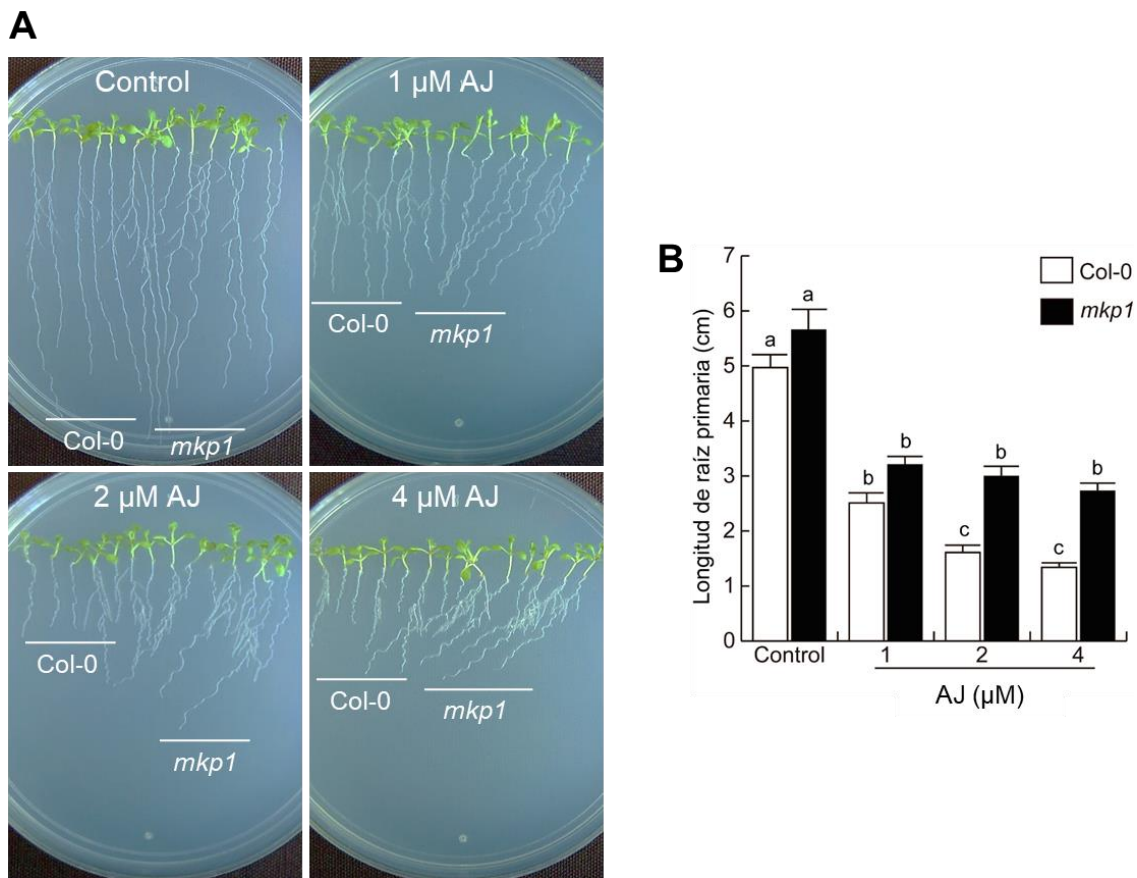


Figura 18. Efecto del ácido jasmónico sobre el crecimiento de plantas Col-0 y *mkp1*. Las plantas fueron germinadas en medio MS 0.2X suplementado con diferentes

concentraciones de ácido jasmónico. El crecimiento se registró diez días después de la germinación. A) Fotos representativas del efecto del ácido jasmónico sobre plantas Col-0 y *mkp1*. B) Crecimiento de la raíz primaria de las plantas tratadas con y sin ácido jasmónico. Los datos muestran la media $\pm$ desviación estándar (n=15). Las letras indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en una prueba estadística de Tukey.

7.6 La serotonina induce la actividad de los represores JAZ1 y JAZ10, a través de MKP1

La resistencia de *mkp1* a los efectos del ácido jasmónico indican que esta fosfatasa orquesta las respuestas a esta fitohormona. Sin embargo, desconocemos qué pasos de la vía se ven influenciados. Para avanzar en dicho entendimiento, se probaron las líneas transgénicas *JAZ1::JAZ1:GFP* y *JAZ10::JAZ10:GFP*, dos construcciones traduccionales de los represores JAZ1 y JAZ10 unidas a su propio promotor y fusionadas al gen reportero GFP, que codifica para la proteína verde fluorescente. Ambas líneas marcadoras fueron movilizadas al fondo genético *mkp1* mediante cruces y las plántulas fueron crecidas en medios control, con 150 μ M de serotonina o con 5, 10 y 20 μ M de JA durante 10 días.

Como se observa en los controles, *JAZ1* es un gen que sólo se induce en presencia de ácido jasmónico, por lo que en la condición control ambas líneas presentaron nula expresión de dicho gen (**Fig. 19A,F**). En las plantas *JAZ1::JAZ1:GFP* tratadas con serotonina, se percibió una fuerte inducción de *JAZ1*, el cual se expresa en los núcleos celulares; esta expresión se concentró especialmente en todo el haz vascular, pero se distribuía a todas las capas celulares de la raíz, incluyendo la cofia, exceptuando únicamente el centro quiescente y el nicho de células iniciales (**Fig. 19E**).

En las plantas tratadas con 5 μ M de ácido jasmónico, que es la concentración a la cual se inhibe el crecimiento de la raíz al mismo nivel que lo hace 150 μ M de serotonina, se observó que la inducción de *JAZ1* no fue tan marcada como con la serotonina. De hecho, la expresión se concentró más en la epidermis, la cofia y la columnela, así como ligeramente en la zona de diferenciación (**Fig. 19B**). Se aumentó la concentración de ácido jasmónico para ver si en concentraciones más altas llegaba a inducirse *JAZ1* de la misma manera que con la serotonina,

obteniendo que en 10 μ M se encontraba más cercana la diferenciación y, por lo tanto, se dio una mayor expresión del marcador, siendo esto aún más marcado en 20 μ M, donde toda la punta de la raíz ya se encontraba diferenciada (**Fig. 19C,D**). Sin embargo, la expresión de *JAZ1* se encontraba más uniformemente distribuida, sin saturar completamente los haces vasculares, lo cual podría deberse al cambio en el tamaño de las células, ocasionado por la serotonina. También es de notar cómo, a diferencia del ácido jasmónico, la serotonina indujo el desarrollo de pelos radiculares. Para el caso de la mutante con el tratamiento de serotonina, se obtuvo una fuerte resistencia, pues presentó una escasa inducción de *JAZ1* que abarcaba únicamente la epidermis, el córtex y la cofia (**Fig. 19J**). En los tratamientos con JA, se mostró también una expresión reducida en 5 μ M, similar a la serotonina (**Fig. 19G**), mientras que, en las concentraciones altas, la expresión de *JAZ1* estuvo más concentrada en las capas externas de la raíz, así como también se percibió levemente en la zona de diferenciación, pero siguió sin extenderse a todos los tejidos (**Fig. 19H,I**). La resistencia de *mkp1* a la expresión de este marcador continuaba, aun aumentando la concentración de ácido jasmónico. Estos resultados sugieren que la serotonina activa la vía del ácido jasmónico, regulando la expresión del represor *JAZ1* en la raíz y, a su vez, este efecto es dependiente de MKP1.

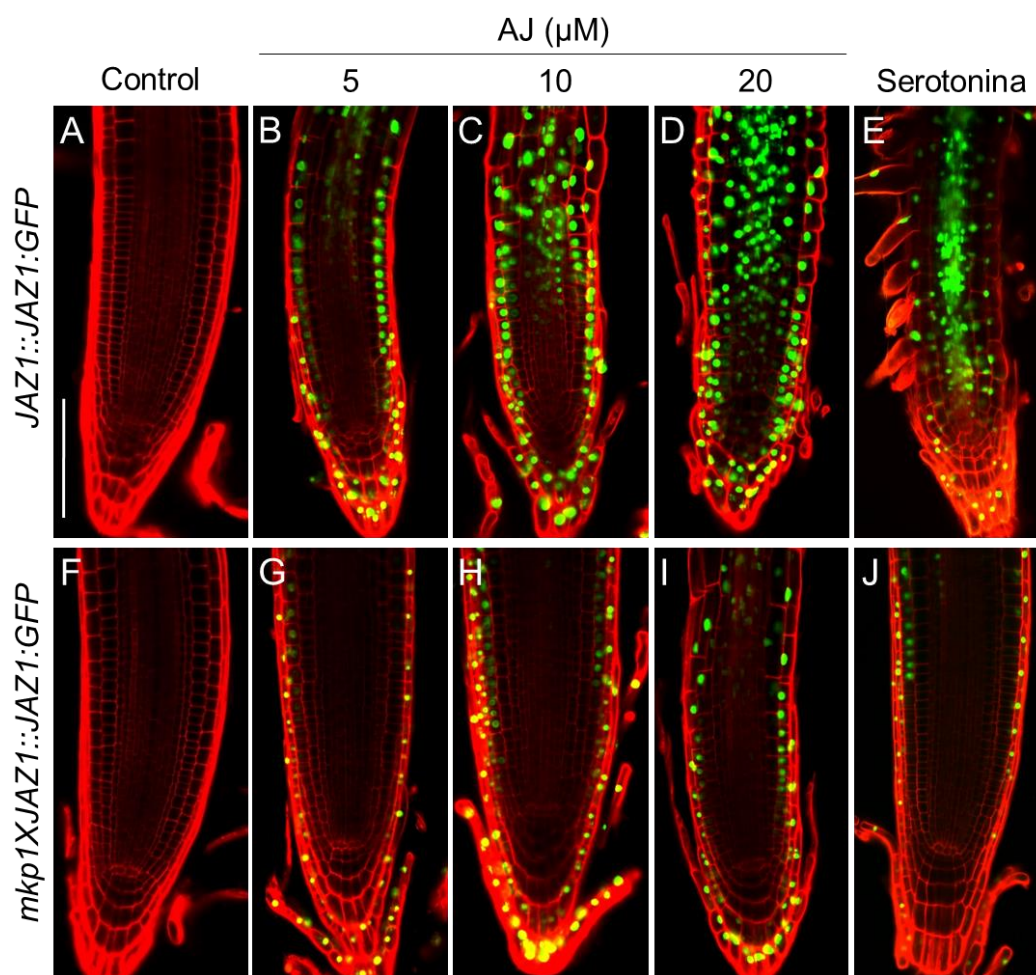


Figura 19. Comparación de la expresión de *JAZ1::JAZ1:GFP* en respuesta a serotonina y ácido jasmónico en plantas *Col-0* y *mkp1*. Fotografías de microscopía confocal representativas de la expresión de *JAZ1::JAZ1:GFP* y *mkp1XJAZ1::JAZ1:GFP*. Las plantas fueron germinadas en medio MS 0.2X y 4 d después de la germinación se transfirieron a medio sin y con 150 μ M de serotonina, así como con diferentes concentraciones de ácido jasmónico (AJ). Las plantas se procesaron a los 7 d posteriores a la transferencia. Barra de escala: 100 μ M.

También se evaluó la expresión de *JAZ10::JAZ10:GFP* con tratamientos de serotonina y ácido jasmónico. *JAZ10* codifica para un represor de la misma familia y es un gen inducible por ácido jasmónico. En condiciones control, se observó que existe una ligera expresión basal rodeando al centro quiescente (**Fig. 20A**); en cambio, en el tratamiento con serotonina, se dio una fuerte inducción de *JAZ10* en todas las capas celulares de la raíz, concentrándose principalmente en el periciclo y la endodermis, así como a lo largo de los haces vasculares (**Fig.20B**).

Particularmente, se detectó una fuerte expresión de este marcador en los pelos radiculares, lo cual sugiere un papel importante de JAZ10 como regulador del desarrollo en respuesta a la serotonina. En el caso de *mkp1xJAZ10::JAZ10:GFP*, no hubo inducción del marcador en ninguno de los tratamientos (**Fig. 20C,D**). Estos resultados evidencian que MKP1 se encuentra cascada arriba de los represores JAZ1 y JAZ10, elementos necesarios en la respuesta de la raíz hacia la serotonina.

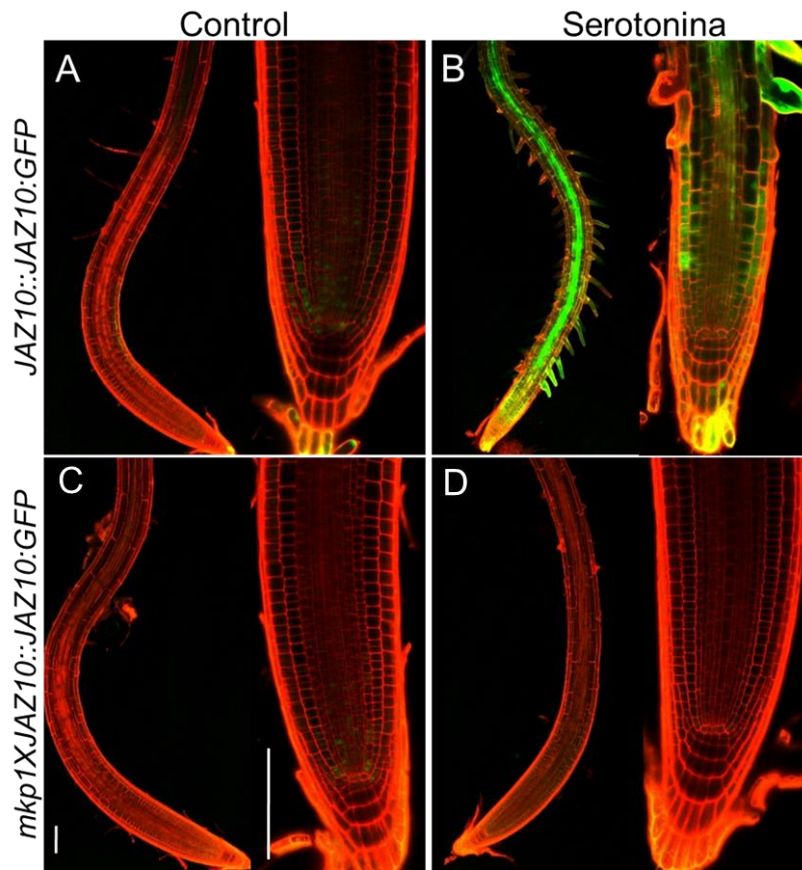


Figura 20. Comparación de la expresión de *JAZ10::JAZ10:GFP* en respuesta a serotonina en plantas Col-0 y *mkp1*. Fotografías de microscopía confocal representativas de la expresión de *JAZ10::JAZ10:GFP* y *mkp1XJAZ10::JAZ10:GFP*. Las plantas fueron germinadas en medio MS 0.2X y 4 d después de la germinación se transfirieron a medio sin y con 150 μ M de serotonina. Las plantas se procesaron a los 7 d posteriores a la transferencia. Barra de escala: 100 μ M.

7.7 La serotonina actúa de manera independiente de LOX2 en plantas Col-0 y *mkp1*

En virtud de que nuestros resultados sugieren que la serotonina y MKP1 son inductores de la señalización del ácido jasmónico en la raíz, también fue de nuestro interés conocer si estos elementos son capaces de inducir su síntesis en follaje. Para esto, se analizó el marcador *LOX2::GUS*, una construcción transcripcional del promotor de *LOX2*, un gen que codifica para una lipoxigenasa involucrada en los primeros pasos de la biosíntesis del ácido jasmónico. En este caso, se observó que en las plantas normales control hubo una mínima actividad basal de *LOX2* (**Fig. 21A,F**), y cómo con el ácido jasmónico esta se encendía en toda el área del cotiledón (**Fig. 21B,G**). En contraste, en los tratamientos con serotonina, se observó cómo estaba completamente reprimida la transcripción de *LOX2*, independientemente de la concentración que se utilice (**Fig. 21C-E**). En el caso de *mkp1* se obtuvieron los mismos resultados (**Fig. 21H-J**). Esto indica que la serotonina está actuando cascada abajo de la síntesis del ácido jasmónico, o bien, que actúa de forma independiente a *LOX2*.

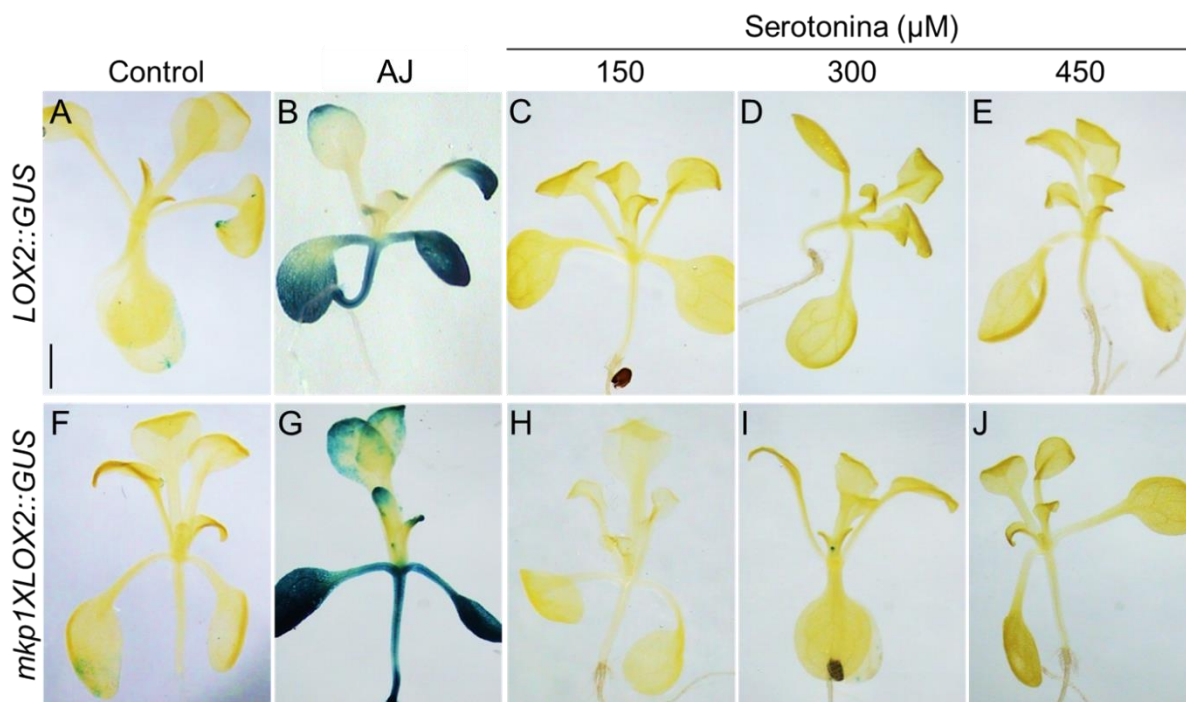


Figura 21. Comparación de la expresión de *LOX2::GUS* en respuesta a serotonina y ácido jasmónico en plantas Col-0 y *mkp1*. Fotografías de microscopía de contraste

representativas de la expresión de *LOX2::GUS* y *mkp1XLOX2::GUS*. Las plantas fueron germinadas en medio MS 0.2X y 4 d después de la germinación se transfirieron a medio sin y con diferentes concentraciones de serotonina, así como con ácido jasmónico como control positivo. Las plantas se procesaron a los 7 d posteriores a la transferencia.

7.8 MKP1 orchestra la acumulación de ERO, en respuesta a serotonina

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) representan un intermediario importante en la activación de la vía MAPK en respuesta al ácido jasmónico (Kreslavski *et al.*, 2012). Como lo reportaron Pelagio-Flores *et al.* (2016), la serotonina induce una mayor producción y redistribución en las ERO en la punta de la raíz de *Arabidopsis*, por lo que fue de nuestro interés conocer si MKP1 estaba también involucrado en este proceso. Para ello, se realizó una cuantificación de ERO totales en plantas Col-0 y *mkp1* tratadas con y sin serotonina, mediante una tinción con H₂DCFDA. En las plantas normales, se observó cómo aumentó la cantidad de ERO, mostrado con mayor intensidad de fluorescencia, en la zona meristemática y de transición (**Fig. 22A,B**). En cambio, en la mutante *mkp1*, desde su tratamiento control se observó una mayor acumulación de ERO que en las plantas normales, la cual a su vez se encontraba redistribuida; pues se localizó más en la zona meristemática y en las capas más externas de esta, dejando prácticamente libre la zona del nicho de células iniciales y la columnela (**Fig. 22C**). En las mutantes tratadas con serotonina, no hubo incremento de ERO, respecto a sus condiciones control, lo que revela que MKP1 regula la producción de ERO.

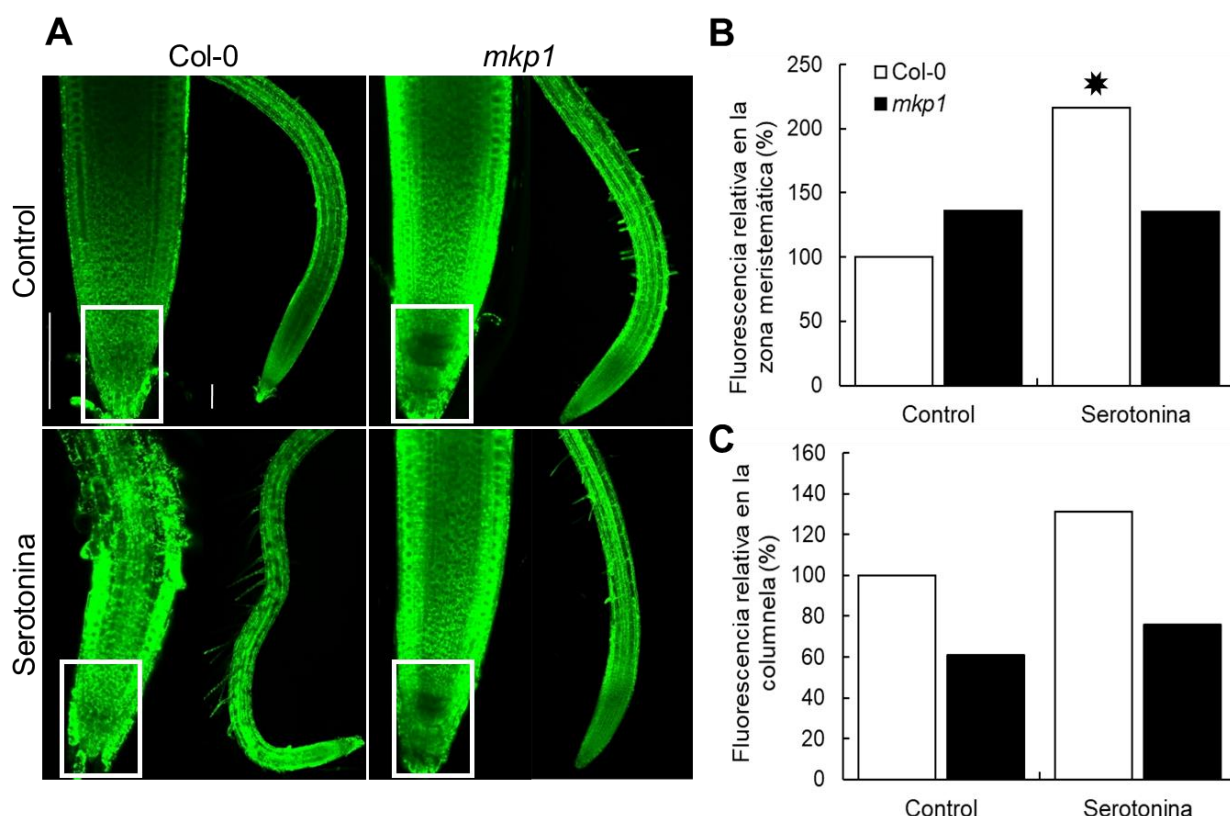


Figura 22. Efecto de la serotonina sobre la acumulación de ERO totales en plantas Col-0 y *mkp1*. Las plantas tratadas sin y con 150 μM de serotonina fueron teñidas con 10 μM H_2DCFDA e incubadas durante una hora para ser procesadas. A) Fotografías representativas en microscopía confocal del efecto de la serotonina sobre la cantidad de ERO totales. B) Cantidad de ERO producidas en la zona meristemática en respuesta a la serotonina. C) Cantidad de ERO producidas en la columna en respuesta a la serotonina. El asterisco indica una diferencia significativa en una prueba de χ^2 seguida de análisis de proporciones $P \leq 0.05$ ($n=10$). Barra de escala: 100 μm .

Para corroborar si este efecto dependía de MKP1, se sometieron plántulas *mkp1* y *35S:MPK6* a tratamientos con serotonina, al mismo tiempo que se incrementaron las concentraciones de la misma, para conocer si la cantidad de ERO correlacionaba con el crecimiento de la raíz primaria en ambos fondos genéticos. Posterior a los tratamientos, se les realizó la tinción con H_2DCFDA . En las plantas normales se obtuvo lo ya esperado, una incrementada producción de ERO en la punta de la raíz ya diferenciada (**Fig. 23A-D**). En *mkp1*, también se visualizaron elevadas cantidades de ERO, significativamente iguales a su control; sin embargo, sí se percibió cómo la raíz ya se encontraba diferenciada debido a las altas concentraciones de serotonina, correlacionado a lo que ya se había observado en

el crecimiento de su raíz primaria (**Fig. 23E-H**). En el caso de la línea sobre expresora de MPK6 se observó que, aunque tenía el mismo fenotipo que *mkp1* en su crecimiento, la producción de ERO no fue la misma (**Fig. 23I-L**). Pues, si bien, esta se mantenía resistente ante el aumento en la producción de ERO causado por la serotonina, las concentraciones iniciales de ERO en *35S:MPK6* no fueron igual de elevadas que en *mkp1*, sino igual a Col-0 (**Fig. 23M**). Esta resistencia en la producción de ERO se correlaciona con lo observado en su crecimiento de la raíz, corroborando aún más que la respuesta a serotonina ocurre a través de un aumento en la cantidad de ERO.

La resistencia por parte de *mkp1*, así como la distribución diferente en la acumulación de ERO, indica que esta fosfatasa media también la producción de ERO en respuesta a serotonina, pero se desconoce a través de qué mecanismos lo hace. No obstante, llamó nuestra atención cómo difería en la mutante la localización de grandes cantidades de ERO, en contraste con las plantas normales.

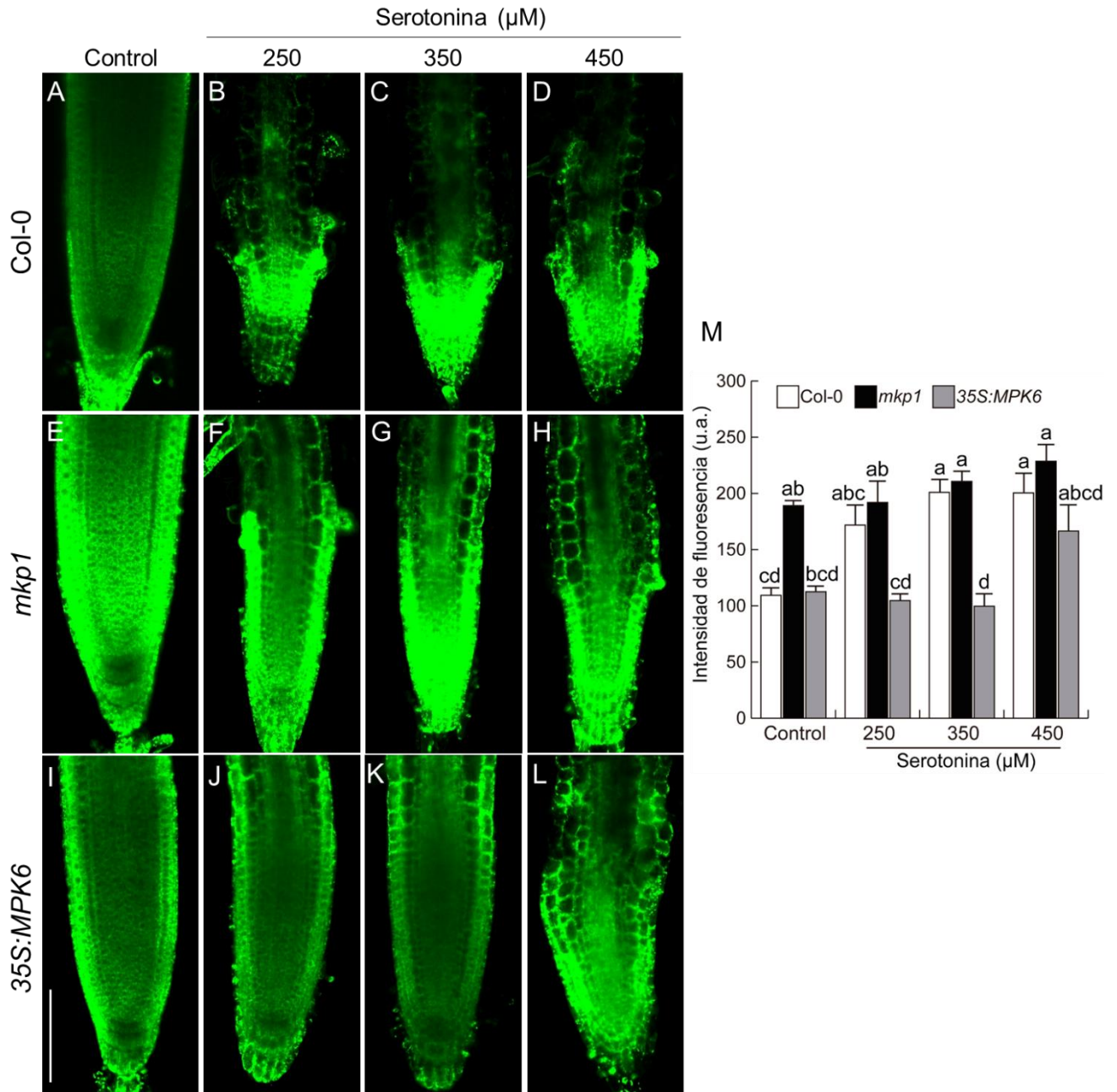


Figura 23. Acumulación de ERO totales en Col-0, *mkp1* y 35S:MPK6 en respuesta a diferentes concentraciones de serotonina. Las plantas tratadas con y sin serotonina fueron teñidas con 10 μM H₂DCFDA e incubadas durante una hora para ser procesadas. A-L) Fotografías representativas en microscopía confocal del efecto de la serotonina sobre la cantidad de ERO totales. M) Cantidad de ERO producida en la zona meristemática en respuesta a la serotonina. Los datos muestran la media $\pm$ desviación estándar (n=5). Las letras indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en una prueba estadística de Tukey. Barra de escala: 100 μm .

7.9 MKP1 regula la producción de H₂O₂ en la punta de la raíz

La distribución de las diferentes ERO es un factor determinante de la organización de las zonas con diferente actividad celular en la punta de la raíz y, por lo tanto, de su desarrollo (Tsukagoshi *et al.*, 2010; Wan *et al.*, 2018b). Dado que MKP1 es un regulador en la producción de ERO y que su distribución en la mutante *mkp1* se ve modificada, se pretendió indagar si esta fosfatasa regula la actividad de alguna ERO en particular. Para conocer si se encontraba regulando la producción de H₂O₂, que es la principal ERO que tiene función como molécula señal (Nazir *et al.*, 2020), se utilizó la construcción genética *35S:HyPER::YFP*, la cual contiene un biosensor que detecta H₂O₂ y se encuentra expresado de manera constitutiva. En las plantas de ecotipo silvestre, la producción normal de H₂O₂ se encontró limitada únicamente en la columnela y la cofia, extendiéndose ligeramente por la epidermis y dejando completamente libre al meristemo. Sin embargo, en las plantas tratadas con serotonina se obtuvo una producción exacerbada de H₂O₂ en toda la zona meristemática, la columnela, así como en los haces vasculares. En *mkp1*, la distribución de H₂O₂ se dio en la misma zona de la cofia y la columnela, sin embargo, la producción de este compuesto fue mucho más baja, pues se vio reducida hasta un 50% menos que en las plantas normales (**Fig. 24**). Esto se correlaciona con lo observado anteriormente con la tinción de ERO totales, donde la zona de la columnela se encontró escasamente teñida. Bajo el tratamiento con serotonina, se observó que el H₂O₂ desaparece completamente, es decir, la producción de esta ERO cesa por completo, al menos en esta zona.

Estos resultados nos permiten concluir lo siguiente: 1) MKP1 es un elemento necesario para la producción de H₂O₂, y 2) que la serotonina induce la producción de H₂O₂, de manera que este funciona como molécula señal para la respuesta celular.

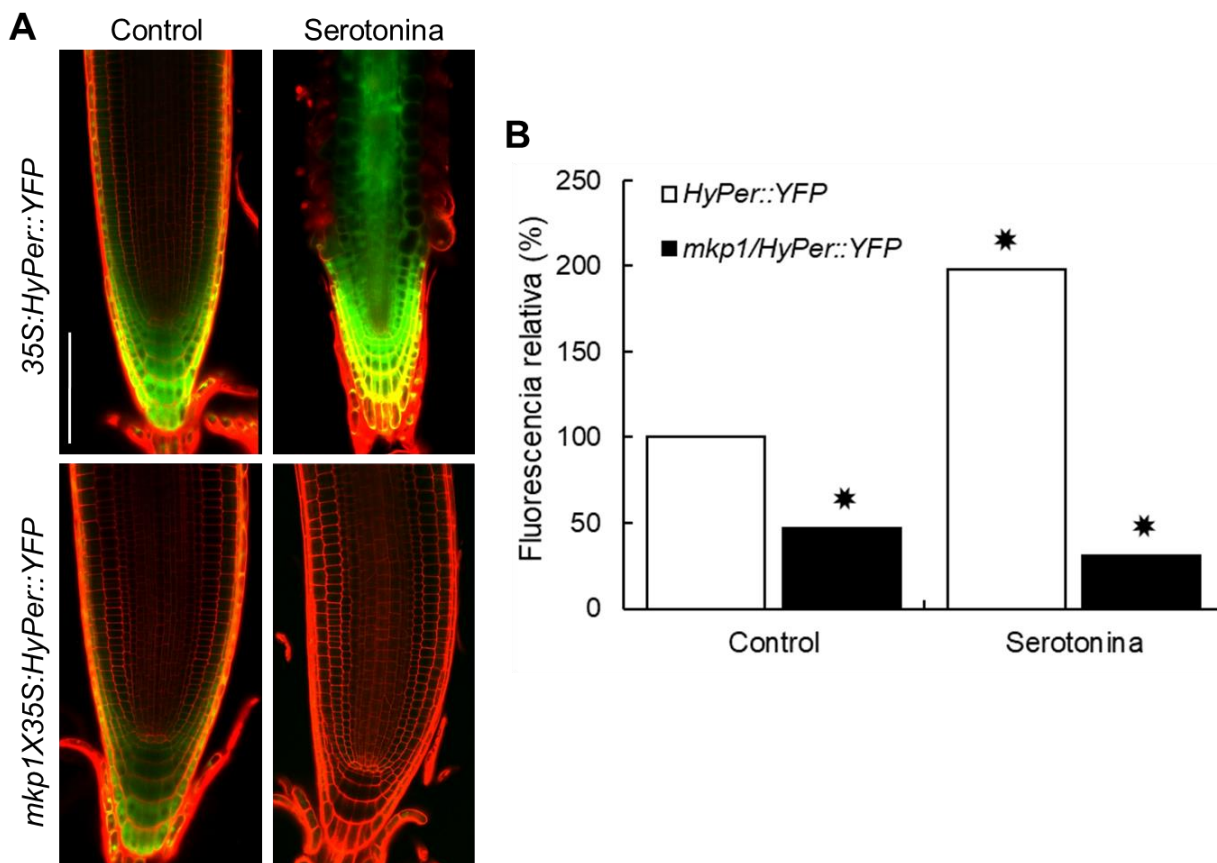


Figura 24. Expresión de 35S:HyPer:YFP en respuesta a serotonina en los fondos genéticos Col-0 y *mkp1*. Las plantas fueron germinadas en medio MS 0.2X y transferidas a medio sin y con 150 μ M de serotonina, 4 días después de la germinación. 7 días después de la transferencia se tiñeron con yoduro de propidio y se analizaron mediante microscopía confocal. A) Fotografías representativas en microscopía confocal de 35S:HyPer:YFP en plantas tratadas con y sin serotonina. B) Cantidad de H₂O₂ en respuesta a la serotonina. El asterisco indica una diferencia significativa en una prueba de χ^2 seguida de análisis de proporciones $P \leq 0.05$ (n=10). Barra de escala: 100 μ m.

Finalmente, fue de nuestro interés conocer si el efecto de la serotonina sobre la raíz es reversible. Dado el supuesto de que dicho efecto es a causa de una elevada producción de ERO y que el cambio en su distribución provoca efectos sobre la morfología de la raíz, quisimos indagar si este efecto puede revertirse al disminuir las concentraciones de ERO añadiendo un antioxidante de manera exógena. Para ello, se utilizaron plantas tratadas previamente con serotonina y se transfirieron a medios suplementados con resveratrol, un compuesto producido a partir del ácido cumárico, conocido por su actividad antioxidante, capaz de eliminar O₂⁻, H₂O₂, OH⁻

y $^1\text{O}_2$ (Truong *et al.*, 2018). Se realizó un escrutinio de cinco tratamientos a las plantas normales y mutantes *mkp1*, organizados de la siguiente manera: 1) un control, 2) un tratamiento únicamente con resveratrol 60 μM , 3) una única transferencia a 150 μM de serotonina, así como plantas que fueron retransferidas de 4) medios con serotonina a medios con resveratrol y, 5) de medios con serotonina a medios MS normales. Posteriormente, se realizó la tinción con H_2DCFDA para ERO totales. En las plantas tratadas con resveratrol (**Fig. 25B,G**), tanto las plantas Col-0 como *mkp1* presentaron una disminución en la cantidad de ERO, en comparación con sus controles (**Fig. 25A,F**), mostrando el fuerte efecto que tiene el resveratrol como molécula antioxidante. En cuanto a las plantas tratadas con serotonina, que fueron regresadas a medios MS normales, se observó que no disminuye la cantidad de ERO que se produjo a causa de la serotonina en las plantas normales, y que tampoco se restaura el tamaño del meristemo (**Fig. 25D,I**). En *mkp1*, la cantidad de ERO continuó igual, tanto en tratamientos control como en los de serotonina. En cambio, en las plantas tratadas con serotonina que se transfirieron a medios con resveratrol, se pudo observar que en las plantas normales sí se disminuyó drásticamente la cantidad de ERO producidas por la serotonina, prácticamente regresándola a niveles basales, incluso se vio reducido en *mkp1* (**Fig. 25E,J**); sin embargo, el efecto sobre la morfología de la raíz y sobre el tamaño del meristemo en Col-0 no se revierte, indicando que otros factores pueden intervenir en este proceso. Por otro lado, esto puede deberse a que el resveratrol esté actuando principalmente sobre la producción de O_2^- , más que de H_2O_2 , pues ya existen reportes de este antioxidante siendo más eficiente para eliminar el O_2^- (Cavallaro *et al.*, 2003; Mahal y Mukherjee, 2006; Wagner *et al.*, 2022).

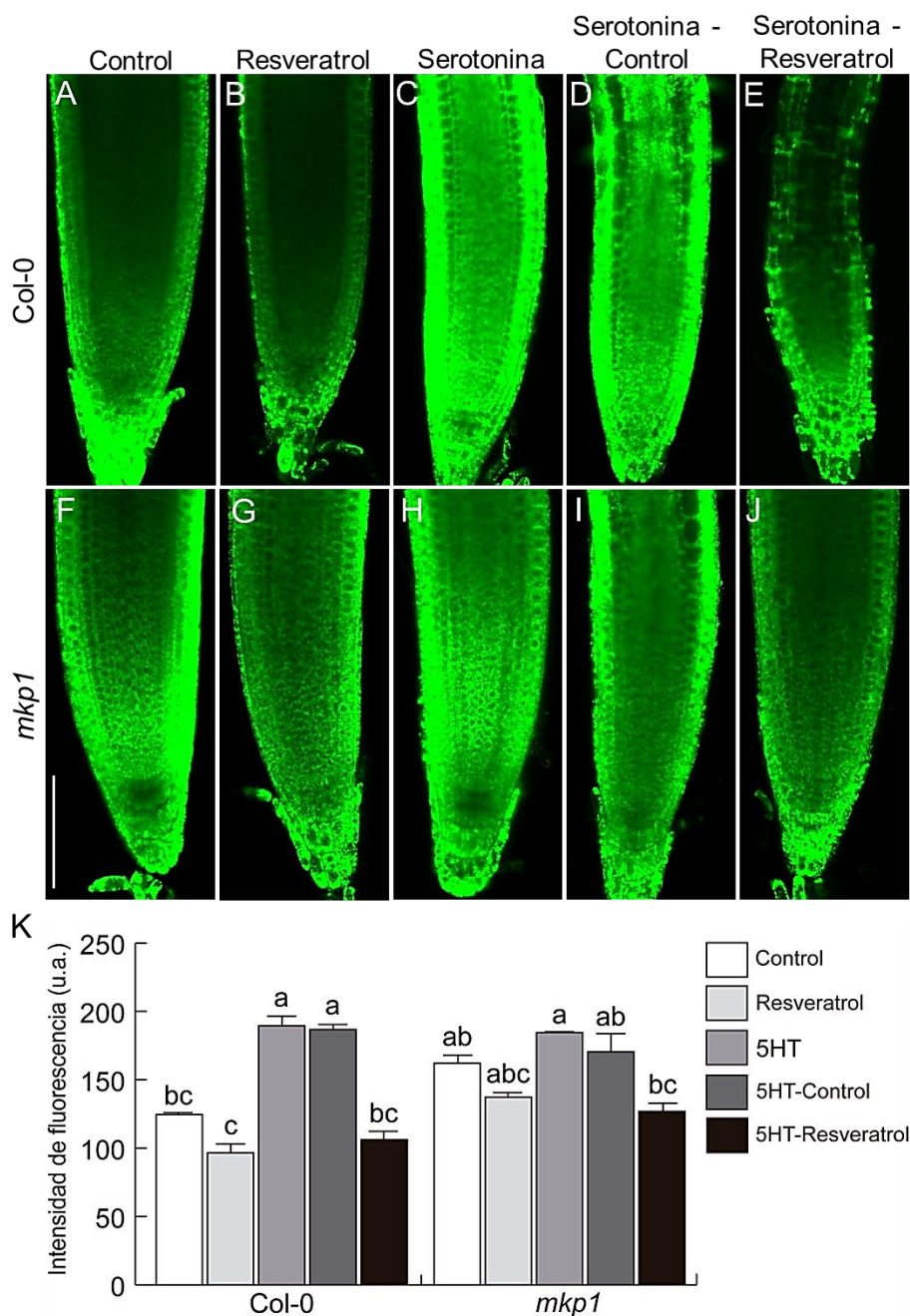


Figura 25. Efecto del resveratrol sobre la producción de ERO en plantas *Col-0* y *mkp1* tratadas con serotonina. Después de 5 días en cada uno de los tratamientos, las plantas fueron teñidas con H₂DCFDA 10 μ M e incubadas durante una hora para ser procesadas. A-J) Fotografías representativas en microscopía confocal del efecto de la serotonina y resveratrol sobre la cantidad de ERO totales. K) Cantidad de ERO producidas en la zona meristemática. Los datos muestran la media $\pm$ desviación estándar (n=4). Las letras indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en una prueba estadística de Tukey. Barra de escala: 100 μ m.

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En los años recientes se ha reconocido el papel de la serotonina como un importante regulador del crecimiento vegetal; particularmente, su capacidad de modificar el crecimiento de la raíz ha sido un amplio tema de estudio. La serotonina tiene un efecto similar a las auxinas sobre la arquitectura radicular, reprimiendo el desarrollo de la raíz primaria y favoreciendo el de las raíces laterales (Pelagio-Flores *et al.*, 2011). No obstante, el mecanismo molecular ocurre independiente a las auxinas y está más relacionado con las vías de señalización del ácido jasmónico y el etileno (Pelagio-Flores *et al.*, 2016; Wan *et al.*, 2018b).

La vía de MAPK regula una plétora de programas de desarrollo y de inmunidad vegetal, así como la respuesta a la raíz hacia algunos aminoácidos, como el glutamato, que es un reconocido neurotransmisor, o el L-Trp, el precursor de importantes metabolitos para las plantas, como lo son las auxinas o la vía de las indolaminas, donde se incluye la serotonina. Ambos aminoácidos provocan modificaciones en la arquitectura radicular y dicha respuesta está mediada por el módulo MPK6-MKP1, uno de los elementos más ampliamente estudiados de la cascada de las MAPK (López-Bucio *et al.*, 2018; García-Valle, 2019; Ravelo-Ortega *et al.*, 2021).

Para evaluar si el módulo MPK6-MKP1 participa en la respuesta a la serotonina en la raíz de *Arabidopsis*, se crecieron plantas mutantes de estos genes en tratamientos con serotonina. Se encontró una gran inhibición del crecimiento de la raíz en las plantas normales y en la mutante *mpk6*, mientras que la mutante *mkp1* se mostró muy resistente a este efecto, indicando una participación importante de esta fosfatasa como regulador de la respuesta a serotonina. Por su parte, *mpk6* mostró un fenotipo muy similar a las plantas normales. Sin embargo, conociendo la estrecha relación que existe entre MKP1 y MPK6, se decidió comprobar lo anterior mediante diferentes estrategias; se utilizaron los mismos tratamientos de serotonina con la línea sobre expresora *35S:MPK6* y la doble mutante *mkp1mpk6*. (Anderson *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2017). Con las plantas *35S:MPK6*, se obtuvo una gran resistencia al efecto de la serotonina, inclusive a concentraciones más altas que con

mkp1. Esta sobre activación de MPK6, al igual que la ocasionada por la falta de MKP1, da como fenotipo la resistencia a serotonina. En el caso de *mkp1mpk6*, se obtuvo una respuesta igual a las plantas normales en su arquitectura radicular. Estos resultados demuestran que, en ausencia de MPK6, se conservan los efectos característicos de esta indolamina, mientras que cuando MPK6 está activada, no permite que haya una correcta respuesta a serotonina en la raíz, como es el caso de su línea sobre expresora y de la mutante deficiente de su regulador negativo, *mkp1*. El fenómeno observado con *mkp1* evidencia que esta fosfatasa funciona como regulador negativo de MPK6, quien, a su vez, regula negativamente la respuesta a serotonina.

El crecimiento de la RP está dado por dos programas celulares en la punta de la raíz: la división celular y la expansión o elongación en el tamaño de dichas células. Estos procesos están regulados mutuamente, pues la tasa de células en división va a permitir que estas pasen a la zona de elongación. Igualmente, cuando las células ya se encuentran aumentando su tamaño o en proceso de diferenciación, se reduce la tasa de división y el meristemo se reduce (Beemster y Baskin, 1998). La serotonina es capaz de regular estos procesos, como lo reportó Pelagio-Flores *et al.* (2011), pero fue de nuestro interés conocer si MKP1 está involucrada en este proceso. Con los tratamientos con la mutante, observamos que, en efecto, era este el caso; *mkp1* fue resistente a la disminución de las tasas de división y elongación celular, así como al proceso adelantado de diferenciación en el meristemo, indicando que la serotonina modifica los programas de división, elongación y diferenciación celular, a través de MKP1.

Como ya lo reportaron Pelagio-Flores *et al.* (2016), la serotonina modifica el desarrollo de la raíz a través de la señalización del ácido jasmónico y etileno, las cuales a su vez están reguladas por MAPK (Jagodzick *et al.*, 2018). Para comprobar si MKP1 es un elemento clave en la correcta señalización de dichas vías, se realizó un escrutinio de la mutante en tratamientos con ACC y ácido jasmónico, en los que se dilucidó que la señalización de etileno puede ocurrir de manera independiente a MKP1, pero no así la del ácido jasmónico, pues la mutante presentó resistencia ante

distintas concentraciones de este compuesto; por lo tanto, quisimos indagar de manera más precisa qué elementos en esta vía está regulando. Para ello, nos ayudamos de líneas reporteras de genes involucrados en la señalización y biosíntesis de ácido jasmónico, como los represores JAZ1 y JAZ10, así como la lipoxigenasa LOX2. Se observó que JAZ1 y JAZ10 se sobre activan en presencia de la serotonina, de manera dependiente de MKP1, mientras que LOX2 en cambio se mantiene reprimida en todas las concentraciones de serotonina, por lo que la respuesta a serotonina mediada por MKP1 es independiente de esta lipoxigenasa. Se ha reportado que el receptor COI1 y JAR1, la enzima que transforma al ácido jasmónico en AJ-Ile, participan en la respuesta a serotonina (Pelagio-Flores *et al.*, 2016). Los resultados que obtuvimos complementan esta información, pues reflejan que la serotonina activa otros elementos en la vía de señalización, como JAZ1 y JAZ10, pero además actúa cascada abajo de la biosíntesis de ácido jasmónico y este proceso ocurre a través de la fosfatasa MKP1.

Las ERO son moléculas oxidantes que, en bajas concentraciones, pueden funcionar como moléculas señal para regular diversos procesos fisiológicos en las plantas, como la activación de las vías de ácido jasmónico y etileno en respuesta a serotonina (Choudhary *et al.*, 2020; Pelagio-Flores *et al.*, 2016). Asimismo, el H₂O₂ es capaz de activar a MKP1 para regular procesos de defensa ante PAMPs bacterianos y fúngicos (Escudero *et al.*, 2019). Nosotros pudimos constatar que MKP1 es un regulador muy importante en la producción y distribución de ERO en la raíz y, por consiguiente, es un regulador clave en el aumento de ERO inducido por la serotonina. Con ayuda de la línea reportera de H₂O₂, 35S:HyPer::YFP, se pudo dilucidar que esto ocurre a través de una regulación positiva en la producción de H₂O₂ por parte de MKP1; por lo tanto, al no estar presente esta fosfatasa, se reprime la producción de H₂O₂ en respuesta a serotonina, evitando que ocurra un desbalance en la distribución de ERO y manteniéndose el estado normal de la raíz primaria. Como lo reportado por Wan *et al.* (2018b), esta distribución de ERO en la raíz y el balance entre H₂O₂ y O₂⁻ son sumamente importantes para la zonificación de diferentes actividades celulares en la punta de la raíz, lo que da como resultado un correcto desarrollo de la misma.

Las plantas han desarrollado a través de la evolución una gran variedad de sistemas de defensa antioxidantes que promueven la remoción de ERO y previenen el daño oxidativo a sus tejidos. El resveratrol es una fitoalexina conocida por su papel como molécula antioxidante al reforzar la producción de enzimas que se encargan de eliminar las ERO (Truong *et al.*, 2018). Por esto fue de nuestro interés conocer si esta molécula es capaz de revertir los efectos ocasionados por la serotonina, al disminuir la cantidad de ERO producidas. Sin embargo, se observó que, aunque sí se revierte la cantidad de ERO, el efecto sobre la conformación de la raíz ya no puede ser revertido, lo cual puede deberse a que existen más elementos involucrados en estos cambios de la arquitectura de la raíz que aún quedan por dilucidar. Los resultados presentados en este trabajo sugieren la participación de MKP1 en regular la respuesta a serotonina en la raíz de *Arabidopsis*, mediante la activación de la vía del ácido jasmónico y la producción y homeostasis de ERO (**Fig. 26**).

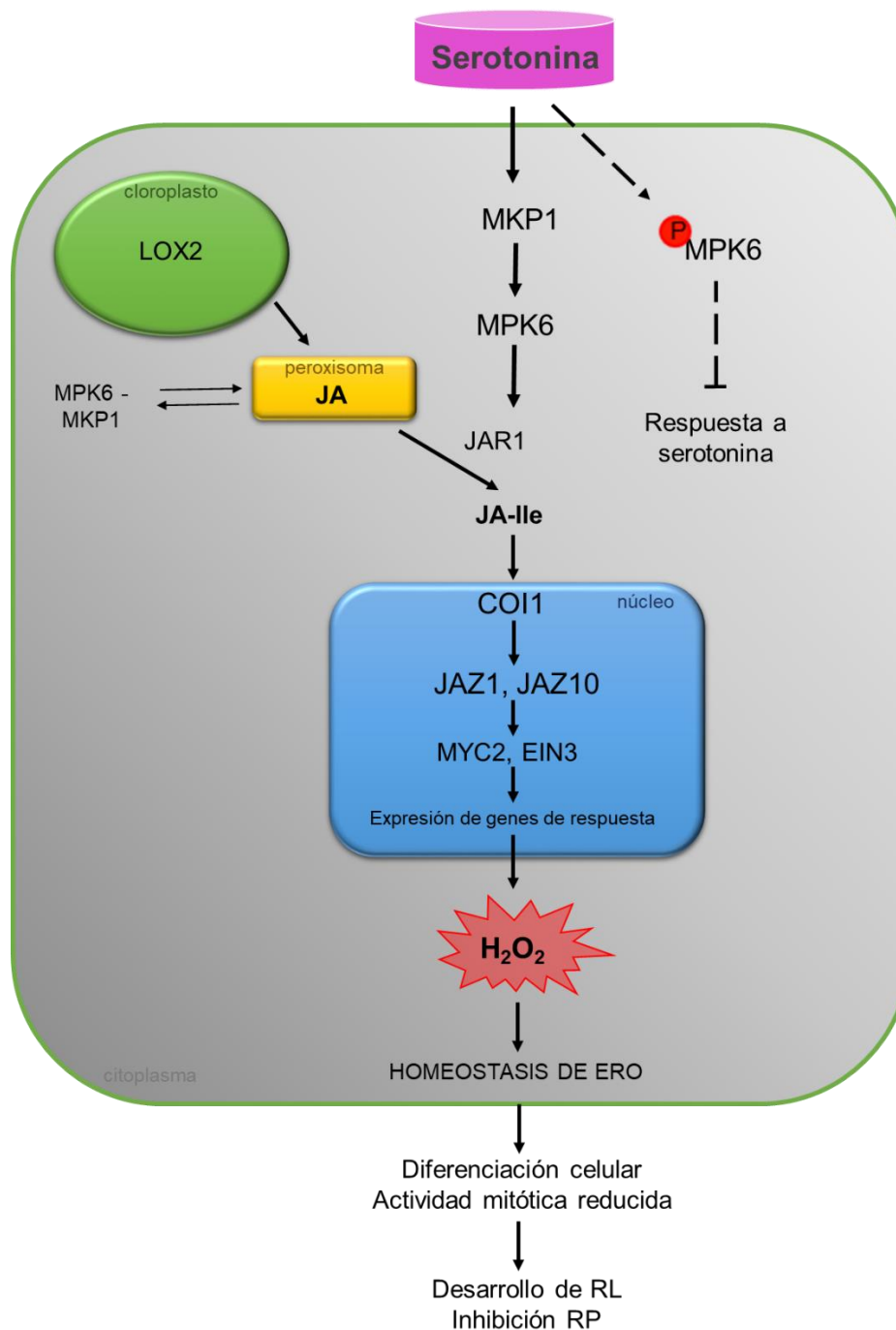


Figura 26. Modelo propuesto de la participación de MKP1 en la respuesta a serotonina, a través de la señalización de ERO y ácido jasmónico. En respuesta a serotonina, MKP1 defosforila a MPK6, lo que activa elementos de la vía de señalización de ácido jasmónico, como JAR1, COI1, JAZ1 y JAZ10, mismos que conllevan a la activación de factores transcripcionales y la respuesta a esta fitohormona. Esto, a su vez, provoca el aumento en la producción de H₂O₂ y, con ello un desbalance en la distribución de ERO en la raíz, dándose una disminución en el crecimiento de la raíz primaria.

9. LITERATURA CITADA

- Ahmad, P., M. Sarwat y S. Sharma. (2008). Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology*, 51(3): 167-173.
- Aldridge, D.C., S. Galt, D. Giles y W.B. Turner. (1971). Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. *Journal of the Chemical Society C: Organic*: 1623-1627.
- Almagro, L., L.V. Gómez Ros, S. Belchi-Navarro, R. Bru, A. Ros Barceló y M.A. Pedreño. (2009). Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of experimental botany*, 60(2): 377-390.
- Anderson, J.C., S. Bartels, M. A. G. Besteiro, B. Shahollari, R. Ulm y S. C. Peck. (2011). *Arabidopsis* MAP Kinase Phosphatase 1 (AtMKP1) negatively regulates MPK6-mediated PAMP responses and resistance against bacteria. *The Plant Journal*, 67(2): 258-268.
- Apel, K. y H. Hirt. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 373-399.
- Baluška, F., S. Mukherjee y A. Ramakrishna. (Eds.). (2020). *Neurotransmitters in plant signaling and communication*. Springer.
- Barrera-Ortiz, S., A. Garnica-Vergara, S. Esparza-Reynoso, E. García-Cárdenas, J. Raya-González, L. F. Ruiz-Herrera y J. López-Bucio. (2018). Jasmonic acid-ethylene crosstalk via ETHYLENE INSENSITIVE 2 reprograms *Arabidopsis* root system architecture through nitric oxide accumulation. *Journal of Plant Growth Regulation*, 37:438-451.
- Bartels, S., M. A. González Besteiro, D. Lang y R. Ulm. (2010). Emerging functions for plant MAP kinase phosphatases. *Trends in Plant Science*, 15: 322-329.
- Bayr, H. (2005). Reactive oxygen species. *Critical care medicine*, 33(12): S498-S501.
- Beemster, G. T. y T. I. Baskin. (1998). Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology*, 116(4): 1515-1526.

- Bowden, K., B.G. Brown y J.E. Batty. (1954) 5-hydroxytryptamine: its occurrence in cowhage. *Nature*, 174: 925-926.
- Bowman, J.L., T. Kohchi, K.T. Yamato, J. Jenkins, S. Shu, K. Ishizaki, ... y J. Schmutz. (2017). Insights into land plant evolution garnered from the *Marchantia polymorpha* genome. *Cell*, 171(2): 287-304.
- Brodersen, P., M. Petersen, H. Bjørn Nielsen, S. Zhu, M.A. Newman, K.M. Shokat, S. Rietz, J. Parker y J. Mundy. (2006). Arabidopsis MAP kinase 4 regulates salicylic acid-and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *The Plant Journal*, 47(4): 532-546.
- Byeon, Y. y K. Back. (2016). Low melatonin production by suppression of either serotonin N-acetyltransferase or N-acetylserotonin methyltransferase in rice causes seedling growth retardation with yield penalty, abiotic stress susceptibility, and enhanced coleoptile growth under anoxi. *Journal of Pineal Research*, 60: 348-359.
- Caarls, L., J. Elberse, M. Awwanah, N.R. Ludwig, M. De Vries, T. Zeilmaker, S.C.M. Van Wees, R.C. Schuurink y G. Van den Ackerveken. (2017). Arabidopsis JASMONATE-INDUCED OXYGENASES down-regulate plant immunity by hydroxylation and inactivation of the hormone jasmonic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(24): 6388-6393.
- Camps, M., A. Nichols y S. Arkinstall. (2000). Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *The FASEB Journal*, 14(1): 6-16.
- Casimiro, I., T. Beeckman, N. Graham, R. Bhalerao, H. Zhang, P. Casero, G. Sandberg y M.J. Bennett. (2003). Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends in Plant Science*, 8(4): 165-171.
- Cavallaro, A., T. Ainis, C. Bottari y V. Fimiani. (2003). Effect of resveratrol on some activities of isolated and in whole blood human neutrophils. *Physiological research*, 52(5): 555-562.

- Chandok, M. R. y S.K. Sopory. (1994). 5-Hydroxytryptamine affects turnover of polyphosphoinositides in maize and stimulates nitrate reductase in the absence of light. *FEBS letters*, 356(1): 39-42.
- Chang, C. (2016). How do plants respond to ethylene and what is its importance? *BMC Biology*, 14(1): 7.
- Choudhary, A., A. Kumar y N. Kaur. (2020). ROS and oxidative burst: Roots in plant development. *Plant diversity*, 42(1): 33-43.
- Cohen, P. T. (1997). Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends in biochemical sciences*, 22(7): 245-251.
- Colcombet, J., y H. Hirt. (2008). Arabidopsis MAPKs: a complex signaling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal*, 413(2): 217-226.
- Creelman, R.A. y J.E. Mullet. (1995). Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(10): 4114-4119.
- Creelman, R. A. y J.E. Mullet. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual review of plant biology*, 48(1): 355-381.
- Danquah, A., A. de Zelicourt, J. Colcombet y H. Hirt. (2014). The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnology advances*, 32(1): 40-52.
- De Grandis, E., M. Serrano, B. Pérez-Dueñas, A. Ormazábal, R. Montero, E. Veneselli, M. Pineda, V. González, F. Sanmartí, C. Fons, A. Sans, B. Cormand, L. Puelles, A. Alonso, J. Campistol, R. Artuch y A. García-Cazorla. (2010). Cerebrospinal fluid alterations of the serotonin product, 5-hydroxyindolacetic acid, in neurological disorders. *Journal of Inherited Metabolic Disease: Official Journal of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism*, 33(6): 803-809.

- Demole E, Lederer E, Mercier D. (1962). Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. *Helvetica Chimica Acta* 45: 675–685.
- Depuydt, S. y C.S. Hardtke. (2011). Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. *Current Biology*, 21(9): 365-373.
- Dóczi, R., G. Brader, A. Pettkó-Szandtner, I. Rajh, A. Djamei, A. Pitzschke, M. Teige y H. Hirt. (2007). The Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase MKK3 is upstream of group C mitogen-activated protein kinases and participates in pathogen signaling. *The Plant Cell*, 19(10): 3266-3279.
- Enders, T. A. y L. C. Strader. (2015). Auxin activity: Past, present, and future. *American journal of botany*, 102(2): 180-196
- Erland, L.A.E., S.J. Murch, R.J. Reiter y P.K. Saxena. (2015). A new balancing act: The many roles of melatonin and serotonin in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior*, 10(11), e1096469.
- Erland, L. A., Turi, C.E., & Saxena, P. K. (2016). Serotonin: An ancient molecule and an important regulator of plant processes. *Biotechnology advances*, 34(8): 1347-1361.
- Erland, L., y P.K. Saxena. (2017). Beyond a neurotransmitter: The role of serotonin in plants. *Neurotransmitter*, 4, e1538.
- Erland, L. A., Turi, C.E., y Saxena, P.K. (2019). Serotonin in Plants: Origin, Functions, and Implications. In *Serotonin* (23-46). Academic Press.
- Escudero, V., M.A. Torres, M. Delgado, S. Sopeña-Torres, S. Swami, J. Morales, A. Muñoz-Barrios, H. Mérida, A.M. Jones, L. Jordá y A. Molina. (2019). Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 (MKP1) negatively regulates the production of reactive oxygen species during Arabidopsis immune responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 32(4): 464-478.

- Fernández-Marcos, M., B. Desvoyes, C. Manzano, L.M. Liberman, P.N. Benfey, J.C. Del Pozo y C. Gutierrez. (2017). Control of Arabidopsis lateral root primordium boundaries by MYB 36. *New Phytologist*, 213(1): 105-112.
- Foreman, J., V. Demidchik, J.H. Bothwell, P. Mylona, H. Miedema, M.A. Torres, P. Linstead, S. Costa, C. Brownlee, J.D.G. Jones, J.M. Davies y L. Dolan. (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, 422(6930): 442-446.
- Foyer, C. H., y G. Noctor. (2009). Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants & redox signaling*, 11(4): 861-905.
- García Valle, K.M. (2019). Participación de las proteínas MPK6 y MKP1 en el crecimiento de la raíz de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a L-Triptófano. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 94 pp.
- Gatineau, F., J.G. Fouché, C. Kevers, J.F. Hausman y T. Gaspar. (1997). Quantitative variations of indolyl compounds including IAA, IAA-aspartate and serotonin in walnut microcuttings during root induction. *Biologia plantarum*, 39(1): 131-137.
- Geiss, G., L. Gutierrez y C. Bellini. (2009). Adventitious root formation: new insights and perspectives. *Annual plant reviews*, 37(1): 127-156.
- Gill, S. S. y N. Tuteja. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12): 909-930.
- Gomi, K., D. Ogawa, S. Katou, H. Kamada, N. Nakajima, H. Saji, T. Soyano, M. Sasabe, Y. Machida, I. Mitsuhashi, Y. Ohashi y S. Seo. (2005). A mitogen-activated protein kinase NtMPK4 activated by SIPKK is required for jasmonic acid signaling and involved in ozone tolerance via stomatal movement in tobacco. *Plant and Cell Physiology*, 46(12): 1902-1914.
- Gonzalez-Besteiro, M. A. y R. Ulm. (2013). ATR and MKP 1 play distinct roles in response to UV-B stress in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 73(6): 1034-1043.

- Guan, L., N. Denkert, A. Eisa, M. Lehmann, I. Sjuts, A. Weiberg, J. Soll, M. Meinecke y S. Schwenkert. (2019). JASSY, a chloroplast outer membrane protein required for jasmonate biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(21): 10568-10575.
- Guo, P., Z. Li, P. Huang, B. Li, S. Fang, J. Chu, y H. Guo. (2017). A tripartite amplification loop involving the transcription factor WRKY75, salicylic acid, and reactive oxygen species accelerates leaf senescence. *Plant Cell*, 29: 2854-2870.
- Gupta, R., y S. Luan. (2003). Redox control of protein tyrosine phosphatases and mitogen-activated protein kinases in plants. *Plant Physiology*, 132:1149–1152
- Grunewald, W., B. Vanholme, L. Pauwels, E. Plovie, D. Inze, G. Gheysen y A. Goossens. (2009). Expression of the Arabidopsis jasmonate signalling repressor JAZ1/TIFY10A is stimulated by auxin. *EMBO reports*, 10(8): 923-928.
- He, H., Y. Lei, Z. Yi, A. Raza, L. Zeng, L. Yan, D. Xiaoyu, C. Yong y Z. Xiling. (2021). Study on the mechanism of exogenous serotonin improving cold tolerance of rapeseed (*Brassica napus* L.) seedlings. *Plant Growth Regulation*, 94(2): 161-170.
- Hernández-Barrera, A., C. Quinto, E.A. Johnson, H.M. Wu, A.Y. Cheung y L. Cárdenas. (2013). Using Hyper as a molecular probe to visualize hydrogen peroxide in living plant cells. *Hydrogen Peroxide and Cell Signaling*, Part B, 275-290.
- Hettenhausen, C., M.C. Schuman y J. Wu. (2015). MAPK signaling: a key element in plant defense response to insects. *Insect science*, 22(2): 157-164.
- Huang, H., F. Ullah, D.X. Zhou, M. Yi, y Y. Zhao. (2019). Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Frontiers in Plant Science*, 10: 800.
- Hutchings, M. J. y H. de Kroon. (1994). Foraging in plants: the role of morphological plasticity in resource acquisition. In *Advances in Ecological Research*, 25: 159-238. Academic Press.
- Ichimura, K., K. Shinozaki, G. Tena, J. Sheen, Y. Henry, A. Champion, M. Kreis, S. Zhang, H. Hirt, C. Wilson, E. Heberle-Bors, B. E. Ellis, P. C. Morris, R. W. Innes, J. R. Ecker,

- D. Scheel, D. F. Klessig, Y. Machida, J. Munsy, Y. Ohashi y J. C. Walker. (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science*, 7: 301-308.
- Ishibashi, Y., T. Tawaratsumida, K. Kondo, S. Kasa, M. Sakamoto, N. Aoki, S.H. Zheng, T. Yuasa y M. Iwaya-Inoue. (2012). Reactive oxygen species are involved in gibberellin/abscisic acid signaling in barley aleurone cells. *Plant Physiology*, 158(4): 1705-1714.
- Ishida, T., T. Kurata, K. Okada y T. Wada. (2008). A genetic regulatory network in the development of trichomes and root hairs. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 365-386.
- Ishimaru, Y., T. Oikawa, T. Suzuki, S. Takeishi, H. Matsuura, K. Takahashi, S. Hamamoto, N. Uozumi, T. Shimizu, M. Seo, H. Ohta y M. Ueda. (2017). GTR1 is a jasmonic acid and jasmonoyl-l-isoleucine transporter in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 81(2): 249-255.
- Jagodzik, P., M. Tajdel-Zielinska, A. Ciesla, M. Marczak y A. Ludwikow. (2018). Mitogen-activated protein kinase cascades in plant hormone signaling. *Frontiers in plant science*: 9, 1387.
- Jaspers, P. y J. Kangasjärvi, J. (2010). Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiologia Plantarum*, 138(4): 405-413.
- Jensen, A. B., D. Raventos y J. Mundy. (2002). Fusion genetic analysis of jasmonate-signalling mutants in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 29(5): 595-606.
- Jiang, L., Chen, Y., Luo, L., y S.C. Peck. (2018). Central roles and regulatory mechanisms of dual-specificity MAPK phosphatases in developmental and stress signaling. *Frontiers in Plant Science*, 9.
- Jones, M.P.A., J. Cao, R. O'Brien, S.J. Murch, P.K. Saxena. (2007). The mode of action of thidiazuron: auxins, indoleamines, and ion channels in the regeneration of *Echinacea purpurea* L. *Plant Cell Reports*, 26:1481e90.

- Kang, S., K. Kang, K. Lee y K. Back. (2007). Characterization of rice tryptophan decarboxylases and their direct involvement in serotonin biosynthesis in transgenic rice. *Planta*, 227: 263-272.
- Kang, K., Y.S. Kim, S. Park y K. Back. (2009). Senescence-induced serotonin biosynthesis and its role in delaying senescence in rice leaves. *Plant Physiology*, 150: 1380-1393.
- Kerk, D., G. Templeton y G.B. Moorhead. (2008). Evolutionary radiation pattern of novel protein phosphatases revealed by analysis of protein data from the completely sequenced genomes of humans, green algae, and higher plants. *Plant Physiology*, 146: 351–367.
- Kim, Y.S., S. Park y K. Back. (2009). Senescence-induced serotonin biosynthesis and its role in delaying senescence in rice leaves. *Plant Physiology*, 150: 1380-1393.
- Kovtun, Y., W.L. Chiu, G. Tena y J. Sheen. (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(6): 2940-2945.
- Kreslavski, V.D., D.A. Los, S.I. Allakhverdiev y V. Kuznetsov. (2012). Signaling role of reactive oxygen species in plants under stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 59: 141-154.
- Krieger-Liszkay, A. (2005). Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of experimental botany*, 56(411): 337-346.
- Kwak, J. M., I.C. Mori, Z.M. Pei, N. Leonhardt, M.A. Torres, J.L. Dangi, R.E. Bloom, S. Bodde, J.D.G. Jones y J.I. Schroeder. (2003). NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *The EMBO journal*, 22(11): 2623-2633.
- Laibach, F. (1907). Zur Frage nach der Individualitat der Chromosomen im Pflanzenreich. Tesis Doctoral. Bonn.
- Leonelli, S. (2007). *Arabidopsis*, the botanical *Drosophila*: from mouse cress to model organism. *Endeavour*, 31(1): 34-38.

- Lewis, T. S., P. S. Shapiro y N. G. Ahn. (1998). Signal transduction through MAP kinase cascades. En *Advances in cancer research* 74: 49-139. Academic Press.
- Li, F.C., J. Wang, M.M. Wu, C.M. Fan, X. Li y J.M. He. (2017). Mitogen-activated protein kinase phosphatases affect UV-B-induced stomatal closure via controlling NO in guard cells. *Plant physiology*, 173(1): 760-770.
- Liu, Y. y S. Zhang. (2004). Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16(12): 3386-3399.
- Liu, Y., X. Ding, Y. Lv, Y. Cheng, C. Li, L. Yan, S. Tian y X. Zou. (2021). Exogenous serotonin improves salt tolerance in rapeseed (*Brassica napus* L.) seedlings. *Agronomy*, 11: 400.
- López-Bucio, J., A. Cruz-Ramírez y L. Herrera-Estrella. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(3): 280-287.
- López-Bucio, J. S., J. G. Dubrovsky, J. Raya-González, Y. Ugartechea-Chirino, J. López-Bucio, L. A. de Luna-Valdés, M. Ramos-Vega, P. León y A. A. Guevara-García. (2014). *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinase 6 is involved in seed formation and modulation of primary and lateral root development. *Journal of Experimental Botany*, 65(1): 169-183.
- López-Bucio, J. S., J. Raya-González, G. Ravelo-Ortega, L. F. Ruíz-Herrera, M. Ramos-Vega, P. León, J. López-Bucio y A. A. Guevara-García. (2018). Mitogen activated protein kinase 6 and MAP kinase phosphatase 1 are involved in the response of *Arabidopsis* roots to L-glutamate. *Plant Molecular Biology*, 96: 339-351.
- Luan, S. (2003). Protein phosphatases in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1): 63-92.
- Lucki, I. (1998). The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biological Psychiatry*, 44(3): 151-162.

- Mahal, H.S. y T. Mukherjee. (2006). Scavenging of reactive oxygen radicals by resveratrol: antioxidant effect. *Research on chemical intermediates*, 32(1): 59-71.
- Manzano, C., M. Pallero-Baena, I. Casimiro, B. De Rybel, B. Orman-Ligeza, G. Van Isterdael, T. Beeckman, X. Draye, P. Casero y J.C. Del Pozo. (2014). The emerging role of reactive oxygen species signaling during lateral root development. *Plant Physiology*, 165(3): 1105-1119.
- Marshall, C.J. (1994). MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Current opinion in genetics & development*, 4(1): 82-89.
- Martínez-de la Cruz, E., E. García-Ramírez, J. M. Vázquez-Ramos, H. R. de la Cruz y J. López-Bucio (2015). Auxins differentially regulate root system architecture and cell cycle protein levels in maize seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 176: 147-156.
- Meinhard, M. y E. Grill. (2001). Hydrogen peroxide is a regulator of ABI1, a protein phosphatase 2C from *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* 508:443–46.
- Meinke, D. W., J.M. Cherry, C. Dean, S.D. Rounsley y M. Koornneef. (1998). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science*, 282(5389): 662-682.
- Meyer, A., O. Miersch, C. Büttner, W. Dathe y G. Sembdner. (1984). Occurrence of the plant growth regulator jasmonic acid in plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 3: 1-8.
- Mhamdi, A. y F. Van Breusegem. (2018). Reactive oxygen species in plant development. *Development*, 145(15): dev164376.
- Mukherjee, S. (2018). Novel perspectives on the molecular crosstalk mechanisms of serotonin and melatonin in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 132: 33-45.
- Mur, L.A., P. Kenton, R. Atzorn, O. Miersch y C. Wasternack. (2006). The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiology*, 140: 249-262.

- Murch, S. J., S. KrishnaRaj y P.K. Saxena. (2000). Tryptophan is a precursor for melatonin and serotonin biosynthesis in in vitro regenerated St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv. Anthos) plants. *Plant Cell Reports*, 19(7): 698-704.
- Murch, S.J., y P.K. Saxena. (2002). Role of indoleamines in regulation of morphogenesis in in vitro cultures of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). In *XXVI International Horticultural Congress: The Future for Medicinal and Aromatic Plants*, 629: 425-432.
- Murch, S.J., A.R. Alan, J. Cao y P.K. Saxena. (2009). Melatonin and serotonin in flowers and fruits of *Datura metel* L. *Journal of Pineal Research*, 47(3): 277-283.
- Nakagami, H., H. Soukupová, A. Schikora, V. Zárský y H. Hirt. (2006). A mitogen-activated protein kinase kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(50): 38697-38704.
- Nazir, F., Q. Fariduddin y T.A. Khan. (2020). Hydrogen peroxide as a signalling molecule in plants and its crosstalk with other plant growth regulators under heavy metal stress. *Chemosphere*, 252: 126486.
- Nguyen, C.T., E. Martinoia y E.E. Farmer. (2017). Emerging jasmonate transporters. *Molecular plant*, 10(5): 659-661.
- Nguyen, C.T., A. Kurenda, S. Stolz, A. Chételat y E.E. Farmer. (2018). Identification of cell populations necessary for leaf-to-leaf electrical signaling in a wounded plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(40): 10178-10183.
- Oka, K., Y. Amano, S. Katou, S. Seo, K. Kawazu y A. Mochizuki (2013). Tobacco MAP kinase phosphatase (NtMKP1) negatively regulates wound response and induced resistance against necrotrophic pathogens and lepidopteran herbivores. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 26(6): 668-675.
- Olivier, B. (2015). Serotonin: A never-ending story. *European Journal of Pharmacology*, 753: 2-18.
- Orman-Ligeza B., B. Parizot, R. de Rycke, A. Fernandez, E. Himschoot, F. Van Breusegem, M.J. Bennett, C. Périlleux, T. Beeckman y X. Draye. (2016). RBOH-

mediated ROS production facilitates lateral root emergence in *Arabidopsis*. *Development*, 143:3328–3339.

Ortiz-Masia, D., M.A. Perez-Amador, P. Carbonell, F. Aniento, J. Carbonell, M.J. Marcote. (2008). Characterization of PsMPK2, the first C1 subgroup MAP kinase from pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*, 227(6): 1333-1342.

Pan, J., M. Zhang, X. Kong, X. Xing, Y. Liu, Y. Zhou, Y. Liu, L. Sun y D. Li. (2012). ZmMPK17, a novel maize group D MAP kinase gene, is involved in multiple stress responses. *Planta*, 235(4), 661-676.

Parthier, B. (1991). Jasmonates, new regulators of plant growth and development: many facts and few hypotheses on their actions. *Botanica Acta*, 104(6): 446-454.

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

Pelagio-Flores, R., E. Muñoz-Parra, R. Ortiz-Castro y J. López-Bucio. (2012). Melatonin regulates *Arabidopsis* root system architecture likely acting independently of auxin signaling. *J Pineal Res* 53(3):279-288.

Pelagio-Flores, R., L.F. Ruiz-Herrera y J. López-Bucio. (2016). Serotonin modulates *Arabidopsis* root growth via changes in reactive oxygen species and jasmonic acid-ethylene signaling. *Physiologia Plantarum*, 158(1): 92-105.

Petersen, M., P. Brodersen, H. Naested, E. Andreasson, U. Lindhart, B. Johansen, H.B. Nielsen, M. Lacy, M.J. Austin, J.E. Parker, S.B. Sharma, D.F. Klessig, R. Martienssen, O. Mattsson, A.B. Jensen y J. Mundy. (2000). *Arabidopsis* MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell*, 103(7): 1111-1120.

Petricka, J. J., C. M. Winter y P. N. Benfey. (2012). Control of *Arabidopsis* root development. *Annual Review of Plant Biology*, 63: 563-590.

- Pieterse, C. M., D. Van der Does, C. Zamioudis, A. Leon-Reyes y S.C. Van Wees. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual review of cell and developmental biology*, 28: 489-521.
- Pillitteri, L.J., K.M. Peterson, R.J. Horst y K.U. Torii. (2011). Molecular profiling of stomatal meristemoids reveals new component of asymmetric cell division and commonalities among stem cell populations in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 23, 3260–3275.
- Pitzschke, A., C. Forzani y H. Hirt. (2006). Reactive oxygen species signaling in plants. *Antioxidants & redox signaling*, 8(9-10): 1757-1764.
- Potters, G., T.P. Pasternak, Y. Guisez y M.A. Jansen. (2009). Different stresses, similar morphogenic responses: integrating a plethora of pathways. *Plant, cell & environment*, 32(2): 158-169.
- Ramakrishna, A., P. Giridhar, G.A. Ravishankar. (2009). Indoleamines and calcium channels influence morphogenesis in in vitro cultures of *Mimosa pudica* L. *Plant Signaling and Behavior*, 4:1136-1141.
- Ramakrishna, A., P. Giridhar, G. A. Ravishankar. (2011a) Phyto serotonin A review. *Plant Signaling & Behavior*, 6: 800-809.
- Ramakrishna, A., P. Giridhar, M. Jobin, C.S. Paulose y G.A. Ravishankar. (2011b). Indoleamines and calcium enhance somatic embryogenesis in *Coffea canephora* P ex Fr. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 108:267-278.
- Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018.
- Ravelo-Ortega, G., J.S. López-Bucio, L.F. Ruiz-Herrera, R. Pelagio-Flores, J.A. Ayala-Rodríguez, H.R. de la Cruz, A.A. Guevara-García y J. López-Bucio. (2021). The growth of *Arabidopsis* primary root is repressed by several and diverse amino acids through auxin-dependent and independent mechanisms and MPK6 kinase activity. *Plant Science*, 302: 110717.

- Rellán-Álvarez, R., G. Lobet y J.R. Dinneny. (2016). Environmental control of root system biology. *Annual review of plant biology*, 67: 619-642.
- Roshchina, V. V. (2001). Molecular-cellular mechanisms in pollen allelopathy. *Allelopathy Journal*, 8(1): 11-28.
- Roshchina, V. V. (2006). Chemical signaling in plant microspore cells. *Biology Bulletin*, 33(4): 332-338.
- Rossomando, A.J., D.M. Payne, M.J. Weber y T.W. Sturgill. (1989). Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(18): 6940-6943.
- Ruan, J., Y. Zhou, M. Zhou, J. Yan, M. Khurshid, W. Weng, J. Cheng y K. Zhang. (2019). Jasmonic acid signaling pathway in plants. *International journal of molecular sciences*, 20(10): 2479.
- Salmon, J. A. y G. A. Higgs. (1987). Prostaglandins and leukotrienes as inflammatory mediators. *British medical bulletin*, 43(2): 285-296.
- Sanchez-Barcelo, E.J., M. D. Mediavilla, J. Vriend y R.J. Reiter. (2016). COP1 and COP9 signalosome, evolutionarily conserved photomorphogenic proteins as possible targets of melatonin. *Journal of Pineal Research*, 61: 41-51.
- Schäfer, E. y C. Bowler. (2002). Phytochrome-mediated photoperception and signal transduction in higher plants. *EMBO reports*, 3(11): 1042-1048.
- Scheres, B. (2007). Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8: 345–354.
- Schippers, J.H., C.H. Foyer y J.T. van Dongen. (2016). Redox regulation in shoot growth, SAM maintenance and flowering. *Current opinion in plant biology*, 29: 121-128.
- Shan, X., J. Yan y D. Xie. (2012). Comparison of phytohormone signaling mechanisms. *Current Opinion in Plant Biology*, 15: 84-91.
- Shi, Y. (2009). Serine/Threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell*, 139:468–484.

- Singh, A., A. Pandey, A.K. Srivastava, L.S.P. Tran y G.K. Pandey. (2016). Plant protein phosphatases 2C: from genomic diversity to functional multiplicity and importance in stress management. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(6): 1023-1035.
- Smith, A.R., I.E. Moshkov, G.V. Novikova y M.A. Hall. (1999). The effect of ethylene and cytokinin on GTP binding and MAP kinase activity in *Arabidopsis thaliana*. In *Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene II* (pp. 77-83). Springer, Dordrecht.
- Sözen, C., S.T. Schenk, M. Boudsocq, C. Chardin, M. Almeida-Trapp A. Krapp, H. Hirt, A. Mithöfer y J. Colcombet. (2020). Wounding and insect feeding trigger two independent MAPK pathways with distinct regulation and kinetics. *The Plant Cell*, 32(6): 1988-2003.
- Staswick, P.E. y I. Tiryaki. (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16(8): 2117-2127.
- Staswick, P.E. (2009). The tryptophan conjugates of jasmonic and indole-3-acetic acids are endogenous auxin inhibitors. *Plant physiology*, 150(3): 1310-1321.
- Takahashi, N., Y. Yamazaki, A. Kobayashi, A. Higashitani y H. Takahashi. (2003). Hydrotropism interacts with gravitropism by degrading amyloplasts in seedling roots of *Arabidopsis* and radish. *Plant physiology*, 132(2): 805-810.
- Takahashi, F., R. Yoshida, K. Ichimura, T. Mizoguchi, S. Seo, M. Yonezawa, K. Maruyama, K. y K. Shinozaki. (2007). The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3–MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19(3): 805-818.
- Takahashi, F., T. Mizoguchi, R. Yoshida, K. Ichimura y K. Shinozaki. (2011) Calmodulin-dependent activation of MAP kinase for ROS homeostasis in *Arabidopsis*. *Molecular Cell*, 41:649–660

- Tamnanloo, F., H. Damen, R. Jangra y J.S. Lee. (2018). MAP KINASE PHOSPHATASE1 controls cell fate transition during stomatal development. *Plant Physiol.* 178: 247–257.
- Thannickal, V. J. y B. L. Fanburg. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(6): 1005-1028.
- Tian, Y., M. Fan, Z. Qin, H. Lv, M. Wang, Z. Zhang, W. Zhou, N. Zhao, X. Li, C. Han, Z. Ding, W. Wang, Z.Y. Wang y M.Y. Bai. (2018). Hydrogen peroxide positively regulates brassinosteroid signaling through oxidation of the BRASSINAZOLE-RESISTANT1 transcription factor. *Nature communications*, 9(1): 1-13.
- Truong, V. L., M. Jun y W.S. Jeong. (2018). Role of resveratrol in regulation of cellular defense systems against oxidative stress. *Biofactors*, 44(1): 36-49.
- Tsukagoshi, H., W. Busch, y P.N. Benfey, (2010). Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell*, 143(4): 606-616.
- Ulm, R., E. Revenkova, G.P. di Sansebastiano, N. Bechtold y J. Paszkowski. (2001). Mitogen-activated protein kinase phosphatase is required for genotoxic stress relief in *Arabidopsis*. *Genes & Development*, 15(6): 699-709.
- Ulm, R., K. Ichimura, T. Mizoguchi, S.C. Peck, T. Zhu, X. Wang, K. Shinozaki y J. Paszkowski. (2002). Distinct regulation of salinity and genotoxic stress responses by *Arabidopsis* MAP kinase phosphatase 1. *The EMBO Journal*, 21(23): 6483-6493.
- Vanneste, S. y J. Friml. (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell*, 136: 1005-1016.
- Verhage, A., S.C. van Wees y C.M. Pieterse. (2010). Plant immunity: it's the hormones talking, but what do they say?. *Plant Physiology*, 154(2): 536-540.
- Vialli, M. y V. Erspamer. (1937). Ricerche sul secreto delle cellule enterocromaffini. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 27(1): 81-99.

- Wagner, A.L.S., F. Araniti, E.L. Ishii–Iwamoto y M.R. Abenavoli. (2022). Resveratrol exerts beneficial effects on the growth and metabolism of *Lactuca sativa* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 171: 26-37.
- Wan, J, P. Zhang, R. Wang, L. Sun, Q. Ju y J. Xu. (2018a). Comparative physiological responses and transcriptome analysis reveal the roles of melatonin and serotonin in regulating growth and metabolism in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*, 18:362.
- Wan J, P. Zhang, L. Sun, S. Li, R. Wang, H. Zhou, W. Wang y J. Xu (2018b) Involvement of reactive oxygen species and auxin in serotonin-induced inhibition of primary root elongation. *Journal of Plant Physiology*, 229: 89-99.
- Wang, P., Y. Du, Y. Li, D. Ren y C.P. Song. (2010). Hydrogen peroxide–mediated activation of MAP kinase 6 modulates nitric oxide biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 22(9): 2981-2998.
- Wang, J., D. Wu, Y. Wang y D. Xie. (2019). Jasmonate action in plant defense against insects. *Journal of Experimental Botany*, 70(13): 3391-3400.
- Wasternack, C. y M. Strnad. (2016). Jasmonate signaling in plant stress responses and development–active and inactive compounds. *New Biotechnology*, 33(5): 604-613.
- Wasternack, C. y I. Feussner. (2018). The oxylipin pathways: biochemistry and function. *Annual review of plant biology*, 69: 363-386.
- Wasternack, C. y B. Hause. (2019). The missing link in jasmonic acid biosynthesis. *Nature plants*, 5(8): 776-777.
- Whitaker-Azmitia, PM. (1999) The discovery of serotonin and its role in neuroscience. *Neuropsychopharmacology*, 21, 2S.
- Woodward, A. W. y B. Bartel. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*, 95: 707-735.
- Xu, J. y S. Zhang. (2015). Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends in plant science*, 20(1): 56-64.

- Yamada, M., X. Han y P.N. Benfey. (2020). RGF1 controls root meristem size through ROS signalling. *Nature*, 577(7788): 85-88.
- Zeng, J., S. Deng, Y. Wang, P. Li, L. Tang y Y. Pang. (2017). Specific inhibition of Acyl-CoA oxidase-1 by an acetylenic acid improves hepatic lipid and reactive oxygen species (ROS) metabolism in rats fed a high fat diet. *Journal of Biological Chemistry*, 292(9): 3800-3809.
- Zimmermann, P., C. Heinlein, G. Orendi y U. Zentgraf. (2006). Senescence-specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant, cell & environment*, 29(6): 1049-1060.