



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE
HIDALGO**

ESCUELA DE QUIMICOFARMACOBIOLOGIA

**“ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES ENTRE ALCAMIDAS,
GLUTAMATO Y ÓXIDO NÍTRICO EN LA REGULACIÓN DE LA
ARQUITECTURA RADICULAR DE *Arabidopsis thaliana*”**

**TESIS QUE PRESENTA
JAVIER RAYA GONZÁLEZ.**

**PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO.**

**DIRECTOR DE TESIS
DR. JOSÉ LÓPEZ BUCIO.**

MORELIA, MICHOACÁN, ABRIL DE 2008.



INDICE

INDICE DE CONTENIDO.....	I
INDICE DE FIGURAS.....	III
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Las plantas como modelo de estudio.....	2
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	3
2.2 <i>Heliopsis longipes</i>	4
2.3 Reguladores de crecimiento.....	4
2.4 Nuevos reguladores de crecimiento.....	5
2.5 Las alcamidas.....	6
2.6 Óxido Nítrico.....	9
2.7 Glutamato.....	12
3. JUSTIFICACION.....	15
4. HIPOTESIS.....	15
5. OBJETIVOS.....	16
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
6.1 Material Biológico.....	17
6.2 Preparación de la semilla.....	17
6.3 Condiciones de crecimiento.....	17
6.4 Variables de crecimiento y análisis de datos.....	18
6.5 Análisis de la acumulación de óxido nítrico.....	18

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
7.1 Efecto del L-Glutamato sobre la arquitectura de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
7.2 Efecto del L-glutamato sobre el crecimiento de plantas silvestres y mutantes afectadas resistentes a L-glutamato en ensayos de transferencia.....	21
7.3 Efecto del L-glutamato en el crecimiento de plantas silvestres y mutantes afectadas en la respuesta a L-glutamato por ensayos de germinación.....	26
7.4 Efecto de N- isobutil decanamida sobre arquitectura de la raíz de <i>A. thaliana</i>	28
7.5 Efecto de la N- isobutil decanamida sobre la arquitectura de la raíz en mutantes afectadas en la respuesta a L-glutamato.....	29
7.6. Efecto del óxido nítrico sobre la arquitectura de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
7.7. Efecto del SNP en la acumulación de óxido nítrico en <i>A thaliana</i>	33
7.8 Efecto del SNP sobre la arquitectura de la raíz en mutantes afectadas a la respuesta de L-glutamato.....	35
7.9. Efecto de la N- isobutil decanamida en la acumulación de óxido nítrico en <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
9. CONCLUSIONES.....	39
10. LITERATURA CITADA.....	40

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Heliopsis longipes</i> y estructura química de alcaloides.....	8
Figura 2. Procesos donde interviene como regulador el óxido nítrico.....	12
Figura 3. Efecto del L-glutamato sobre la arquitectura de la raíz de <i>A. thaliana</i>	20
Figura 4. Efecto del L-glutamato sobre el crecimiento de la raíz primaria en plantas silvestres (Ler) y las mutantes resistentes a L-glutamato.....	22
Figura 5. Fotografías del efecto del L-glutamato sobre el crecimiento y desarrollo de plantas silvestres y mutantes.....	24
Figura 6. Efecto del L-glutamato sobre la arquitectura de la raíz de plantas silvestres y mutantes en ensayo de transferencia.....	25
Figura 7. Efecto del L-glutamato sobre la arquitectura de la raíz de plantas silvestres y mutantes en ensayos de germinación en el medio...	27
Figura 8. Efecto de la <i>N</i> - isobutil decanamida sobre la arquitectura de la raíz de plantas de <i>A. thaliana</i>	29
Figura 9. Efecto de la <i>N</i> - isobutil decanamida sobre la arquitectura de la raíz en plantas silvestres y mutantes resistentes a L-glutamato.....	30
Figura 10. Efecto del SNP sobre la arquitectura de la raíz de <i>A. thaliana</i> .	32

Figura 11. Efecto del SNP sobre la acumulación de óxido nítrico en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	34
Figura 12. Efecto del SNP en la arquitectura de la raíz de plantas silvestres y mutantes resistentes a L-glutamato.....	36
Figura 13. Acumulación de óxido nítrico en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> en respuesta a concentraciones de <i>N</i> - isobutil decanamida.....	38

RESUMEN

Las plantas organizan las diferentes etapas de su ciclo de vida de acuerdo a la integración de señales ambientales en patrones de crecimiento. Diversos reguladores del crecimiento incluyendo a las auxinas, el etileno y las citocininas, coordinan las respuestas celulares de división, crecimiento y diferenciación y modifican la arquitectura de la raíz y del follaje. Recientemente se describió una nueva clase de compuestos de carácter lipídico, las alcanidas, también se han reportado otras moléculas como es el óxido nítrico (ON) y el L-glutamato, las cuales causan efectos similares al de las alcanidas en la morfogénesis vegetal. En el presente trabajo se analizaron los efectos de la *N*-isobutil decanamida, una alcanida cuya presencia se ha descrito en diferentes especies de plantas, el L-glutamato, un aminoácido importante para el metabolismo y el óxido nítrico, un segundo mensajero presente en plantas y animales que participan en la regulación de la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis*. Los tratamientos con las diferentes moléculas mostraron efectos similares, inhibiendo el crecimiento de la raíz primaria y estimulando el crecimiento de las raíces laterales. Para determinar una posible interacción entre las rutas de señalización del L-glutamato, la *N*-isobutil decanamida y el ON, se estudiaron los efectos del L-glutamato en la morfogénesis de mutantes resistentes a esta molécula. Posteriormente estas mutantes se evaluaron bajo tratamientos con *N*-isobutil decanamida y SNP, un compuesto donador de ON. Las mutantes presentaron una inhibición del crecimiento de la raíz primaria similar al de las plantas silvestres, indicando que los efectos del glutamato ocurren por mecanismos independientes a los de la alcanida y el ON. Para determinar una posible interacción entre la *N*-isobutil decanamida y el ON, se analizaron de manera independiente los efectos de éstas dos moléculas en concentraciones crecientes en el desarrollo de la raíz primaria y en la acumulación de ON en la raíz. Ambas moléculas provocaron alteraciones similares en el desarrollo y en la acumulación de ON en las plántulas tratadas con cada uno de los compuestos. Los resultados obtenidos sugieren una probable interacción entre las vías de señalización del ON y las alcanidas y demuestran que las alteraciones en el desarrollo de la raíz en respuesta a glutamato ocurren por mecanismos independiente a los del ON y las alcanidas.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Las plantas como modelo de estudio.

Las plantas como organismos sésiles pasan su ciclo de vida ancladas a un sustrato. De manera general, anatómica y fisiológicamente, se pueden dividir en dos sistemas: el sistema aéreo o follaje y el sistema radicular. El follaje está constituido por el tallo, las ramas y las hojas, que se derivan de la actividad proliferativa del meristemos apical (Norberg *et al.*, 2005). En las hojas es donde ocurre la fotosíntesis, que es la principal fuente de carbohidratos para los tejidos consumidores de la planta incluyendo a la raíz, las flores y los frutos. Las raíces tienen como funciones el anclaje de la planta al suelo y la captación de nutrientes y agua. El sistema radicular consta de tres partes principales: la raíz primaria, las raíces laterales y los pelos radiculares. El crecimiento de la raíz ocurre por la producción de nuevas células en el meristemo radicular, que se localiza en la parte distal de la raíz protegido por la cofia y es la región donde se lleva a cabo la división celular. Después de dividirse, las células pasan a la zona de elongación donde aumentan de tamaño antes de diferenciarse. Las raíces laterales surgen a partir de las células del periciclo, que es un tejido adyacente al sistema vascular para formar un nuevo meristemo con actividad proliferativa independiente del meristemo de la raíz primaria. La función de las raíces laterales es aumentar la superficie de absorción de la raíz y la exploración del suelo (Himanen *et al.*, 2002; Oakenful *et al.*, 2003). La arquitectura del follaje y de la raíz está determinada por diversas clases de sustancias conocidas como reguladores del crecimiento o fitohormonas, entre las que se incluyen las auxinas, las citocininas, el etileno, el ácido abscísico, las giberelinas y los brasinoesteroides. Estos diferentes compuestos, además de regular aspectos biológicos fundamentales tales como la división, la elongación y la diferenciación celular, también actúan como señales que permiten ajustar los programas de desarrollo en respuesta a factores ambientales. En los últimos años se ha evidenciado la presencia en las plantas de compuestos con función reguladora caracterizados anteriormente en los animales, que incluyen a las *N*-acil etanolaminas, el glutamato y el óxido

nítrico. En particular, las *N*-acil etanolaminas son similares estructuralmente a las alcanidas, un grupo de moléculas lipofílicas pequeñas compuestas por una cadena de ácido graso de 10 carbonos asociada a una amida. Aunque el efecto de la aplicación exógena de alcanidas sobre el desarrollo vegetal ha sido estudiado ampliamente en nuestro grupo de trabajo (Ramírez-Chávez *et al.*, 2004; López-Bucio *et al.*, 2007; Campos-Cuevas *et al.*, 2008), poco se sabe sobre los mecanismos genéticos y moleculares que regulan las respuestas de las plantas a estos compuestos.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Arabidopsis thaliana*.

Muchos de los avances que actualmente existen en el conocimiento acerca de los mecanismos moleculares y bioquímicos que controlan el desarrollo de las plantas, se han realizado utilizando a *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis* es una planta que pertenece a la familia Brassicaceae que tiene numerosas ventajas. En primer lugar, *Arabidopsis* es pequeña (30 cm) y fácil de manipular en el laboratorio, además, es posible generar mutantes en un tiempo de generación muy corto (6-8 semanas). Existen bancos de semilla dedicados a generar mutantes de adquisición por catálogo mediante el tratamiento con sustancias químicas o radiaciones. *Arabidopsis* posee alrededor de 20, 000 genes, que en conjunto comprende un genoma muy pequeño comparado con el de otras angiospermas, por lo que facilita los métodos de clonación para aislar los genes definidos por las mutaciones.

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

2.2. *Heliopsis longipes*.

Mejor conocido como “chilcuague”, es una angiosperma utilizada como un recurso de uso medicinal en el estado de Guanajuato. En la medicina popular se utiliza como analgésico, anestésico y antibiótico para infecciones de los aparatos respiratorios y digestivo. El chilcuague crece en forma silvestre y también se le cultiva de manera rudimentaria (Fig. 1 A). Tiene una larga tradición en la herbolaria indígena, sus nombres vulgares son de origen náhuatl: chilmécatl (de *chili*, chile y *mecatl*, mecate, de acuerdo a sus raíces filiformes y al sabor picante de éstas) y chilcuague (chile de vívora). Esta planta acumula una gran cantidad de compuestos lipídicos muy activos conocidos como alcanidas en sus raíces (García-Chávez *et al.*, 2004), y fue la primera especie en donde se reportó la presencia de una alcanida oleofínica, la afinina.

La afinina es un compuesto formado por un ácido graso de una cadena de 10 carbonos con tres insaturaciones unido a una isobutilamida. La afinina pertenece al grupo de compuestos denominado alcanidas oleofínicas, que incluye alrededor de 70 diferentes moléculas con diferente longitud en la cadena del ácido graso y con diferente grado de saturación (Molina-Torres *et al.*, 1996). Una de las alcanidas con mayor actividad biológica descrita en plantas es la *N*-isobutil decanamida (decanamida), esta sustancia se puede obtener mediante reducción catalítica de la afinina y se caracteriza por tener una cadena de ácido graso saturada. La decanamida se encuentra en pequeñas concentraciones en diferentes especies vegetales provenientes de diferentes familias; sin embargo, se desconoce casi por completo la relevancia biológica de esta sustancia, su papel en la fisiología de las plantas y sus mecanismos de acción sobre el desarrollo vegetal.

2.3. Reguladores de crecimiento.

Las plantas producen diversas sustancias que regulan su crecimiento y desarrollo, estas sustancias son denominadas hormonas vegetales o reguladores del crecimiento (RC) las cuales ejercen funciones mediante programas de señalización intracelular específicos que conducen al encendido o apagado de genes (del Pozo *et al.*, 2005).

Por sus efectos biológicos y por su distribución amplia en el reino vegetal se consideran 6 clases principales de RC: las auxinas, las citocininas, las giberelinas, el etileno, el ácido abscísico y los brasinoesteroides. Los RC son compuestos de diferente naturaleza química que pueden alterar el desarrollo vegetal en concentraciones pequeñas. El concepto de hormona tal como fue desarrollado en los animales no es fácil de extrapolar a las plantas. Por un lado las plantas no cuentan con un sistema de transporte como la circulación sanguínea, por otro lado las plantas no tienen el equivalente a un sistema nervioso central como el de los animales para la integración y la coordinación de todas las actividades fisiológicas.

Aun así, las plantas tienen un sistema sofisticado para integrar información del ambiente y responder activamente a los estímulos bióticos y abióticos; de igual manera, poseen mecanismos para la comunicación entre los diferentes órganos y tejidos. Actualmente se acepta que los reguladores de crecimiento forman un grupo de moléculas integradoras de información, cuyas vías de señalización interactúan con frecuencia para regular la morfogénesis vegetal y las respuestas al ambiente (López-Bucio *et al.*, 2006).

Las hormonas vegetales son generalmente moléculas pequeñas, que ejercen sus efectos biológicos a concentraciones bajas y regulan aspectos celulares diversos (Weyers y Paterson, 2001). Estos compuestos se pueden transportar entre los diferentes tejidos a través del sistema vascular (xilema y floema), como en el caso de las auxinas o mediante los espacios intercelulares como el etileno (Gray, 2004).

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

2.4. Nuevos reguladores del crecimiento.

Recientemente se ha evidenciado la existencia de un grupo nuevo de RC que incluye moléculas derivadas de la hidrólisis de fosfolípidos, entre los que están los esfingolípidos, el ácido fosfatídico y las alcanidas.

Estas moléculas son producidas por los eucariontes en general. Los esfingolípidos y el ácido fosfatídico se han encontrado en animales regulando importantes rutas de señalización y recientemente en plantas donde controlan diferentes aspectos adaptativos tales como la apertura de los estomas y la respuesta a patógenos (Chapman, 2004; Motes *et al.*, 2005). Las alcamidas regulan la arquitectura de la raíz de las plantas a través del control de la división, la elongación y la diferenciación celular (Ramírez-Chávez *et al.*, 2004).

Además de las alcamidas, se han identificado otras moléculas importantes para el desarrollo de las plantas, como el óxido nítrico (ON), el cual ha sido descrito en animales como un segundo mensajero y se ha identificado como el factor de relajación derivado del endotelio en células del músculo liso (Ignarro *et al.*, 1987). Recientemente se ha estudiado también en las plantas debido a que interviene en procesos fisiológicos diversos (Correa-Aragunde *et al.*, 2006).

El glutamato (GLU) es un neurotransmisor importante de sistemas animales que también en las plantas regula diferentes procesos fisiológicos, al aplicarse L-glutamato de manera exógena a plántulas de *Arabidopsis thaliana* en concentraciones micromolares, se producen cambios fácilmente perceptibles en el desarrollo de la raíz (Forde *et al.*, 2006).

2.5. Las alcamidas.

Las alcamidas fueron considerados inicialmente como metabolitos secundarios que comprenden más de 200 compuestos relacionados entre sí. Desde el punto de vista estructural, las alcamidas representan una clase particular de productos naturales que se forman al combinarse dos diferentes rutas metabólicas. Están constituidas por la acción de un ácido graso, de longitud de cadena de mediana o larga que puede variar desde ocho hasta dieciocho carbonos generalmente alifática o lineal, unida a una amina procedente de algún aminoácido por descarboxilación al momento de su condensación (Fig. 1 B,C). Dependiendo del número de enlaces o ligaduras dobles que presentan las alcamidas se han dividido en dos grupos principales: alcamidas olefínicas que solo tienen dobles ligaduras y alcamidas acetilénicas, con al menos una triple ligadura. Las alcamidas son consideradas como

compuestos bioactivos, lo que significa que una pequeña cantidad de estos compuestos presenta una respuesta notable en las células receptoras. Estos compuestos están presentes en varias familias de plantas entre ellas: Aristolochiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Convolvaceae, Euphorbiaceae, Menispermaceae, Peperaceae, Poaceae, Rutaceae y Solanaceae (Molina-Torres y Ramírez-Chávez., 2001).

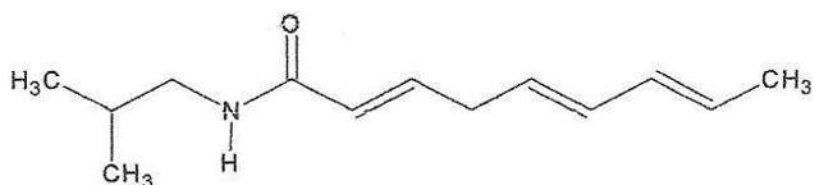
Entre las plantas que contienen alcanidas en sus tejidos están *Echinacea purpurea*, *Echinacea angustifolia* y *Heliopsis longipes*, comúnmente los extractos de estas plantas son utilizados para el tratamiento del resfriado común e infecciones de las vías respiratorias y se ha estudiado la posibilidad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

En las raíces de *Heliopsis longipes*, García-Chávez y col. en el 2004 encontraron un contenido total de alcanidas de 9.369 µg/g de peso seco de raíz repartido en 8 compuestos, de los cuáles de acuerdo a la longitud del ácido graso prevalecían las decanidas (alcanidas de 10 átomos de carbono) seguidas por las undecanidas (11 átomos de carbono). La alcanida mayoritaria es la afinina, que se encuentra hasta en 1% de peso fresco y a ella se le atribuye los efectos específicos observados a estas raíces, entre los que se pueden considerar su acción como anestésico local, el estímulo organoléptico, así como su actividad insecticida y bactericida, por lo que se considera que las alcanidas deben constituir un elemento de defensa contra herbivoría y ataques de patógenos de las plantas que las contienen (García-Chávez *et al.*, 2004; Ramírez-Chávez *et al.*, 2004) (Fig. 1B).

A)



B)



C)

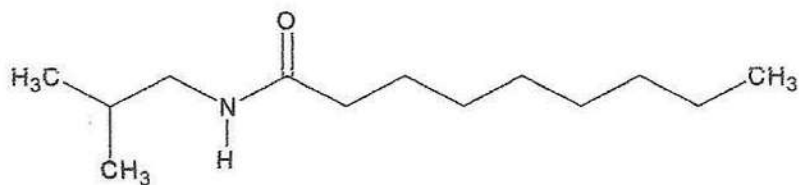


Figura 1. *Heliopsis longipes* y la estructura química de las alcamidas. A). Fotografía de una planta de *Heliopsis longipes*. B). Estructura de la *N*-isobutil-2E,6Z,8E-decatrinamida (afinina). C) Estructura de la *N*-isobutil decanamida.

Una de las diferencias importantes en el modo de acción de las alcamidas en la morfogénesis vegetal comparado con el de la auxinas es que mientras las auxinas inducen la formación de las raíces laterales a bajas concentraciones, las alcamidas tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento de la raíz primaria ($10^{-8} - 10^{-7}$ M) y pueden inducir la formación de raíces laterales en una concentración que estimula el crecimiento de la raíz primaria ($10^{-6} - 10^{-5}$ M) (Ramírez-Chávez *et al.*, 2004; Campos-Cuevas *et al.*, 2008). Dos reportes indican que las alcamidas también son capaces de modificar el crecimiento de las plantas y que podrían tener un papel importante en su crecimiento y

morfogénesis. El primero de ellos en el cual se estudio el efecto de la amidenina que es una alcalamida aislada del actinomiceto *Amycolatopsis sp.*, sobre el crecimiento de plantas de arroz (*Oryza sativa*), se mostró que la aplicación de este compuesto en concentraciones de 6-18 μM estimula en un 20% la producción de biomasa en follaje y hasta un 50% de biomasa en raíz. También se mostró que en concentración de 60 μM este compuesto presenta un efecto represor del crecimiento en el follaje y la raíz (Kambe *et al.*, 1993).

El otro reporte que se tiene sobre las alcalamidas proviene de nuestro grupo de trabajo, en donde se muestra que la afinina altera el crecimiento y desarrollo del sistema radicular de *Arabidopsis*. En concentraciones de 7-14 μM de este compuesto se observa un efecto inductor del crecimiento de raíz primaria y de la formación de raíces laterales y en concentraciones mas altas como 28 y 56 μM se presenta un efecto de inhibición en el crecimiento de la raíz primaria y de las raíces laterales. Además de estos efectos de la afinina se ha encontrado que también estimulan el crecimiento de los pelos radiculares (Ramírez-Chávez *et al.*, 2004).

2.6. Óxido nítrico.

El óxido nítrico (ON) es un radical pequeño, gaseoso, de carga neutra, que posee una gran afinidad hacia metales de transición (Fe, Cu, Zn) y reacciona rápidamente con el radical superóxido (O_2^-) y el oxígeno molecular (O_2). El ON es soluble tanto en ambientes hidrofóbicos como hidrofílicos, aunque prefiere los primeros.

Las características químicas y físicas del ON le confieren la propiedad de atravesar fácilmente las membranas biológicas y en consecuencia de difundirse extra- e intercelularmente con relativa facilidad. Su vida media es corta (menos de un segundo) pero su gran reactividad química le confiere las características de un efector biológico potente. De hecho, el ON regula la actividad y expresión de proteínas y enzimas que actúan en eventos de señalización celular involucrados en las respuestas fisiológicas de las plantas a diversos estímulos endógenos y exógenos.

El ON fue descubierto por John Priestley hace ya más de 200 años, pero recién hacia fines del siglo XX (décadas del '70 y '80), se demostró que el NO es el principio activo responsable de la relajación muscular y tonicidad de los vasos sanguíneos y se le considera una molécula clave en sistemas biológicos. Posteriormente, los investigadores Furchgott, Murad e Ignarro, quienes descubrieron y describieron la actividad biológica del ON aislándolo como factor derivado del endotelio (EDRF) y responsable de la relajación muscular, fueron premiados con el Nobel en el año 1998.

En las plantas existen dos vías principales de generación de ON. Una es la vía biosintética, en la que al menos dos actividades enzimáticas bien definidas son responsables de la producción de ON: la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) que utiliza arginina y O_2 para generar citrulina y ON y la enzima nitrato reductasa (NR) que normalmente reduce el NO_3^- a NO_2^- , pero que también posee una actividad intrínseca a través de la cual, en condiciones en que el NO_2^- se acumula a concentraciones milimolares, es capaz de reducir el NO_2^- a NO. Otras actividades enzimáticas generadoras de ON que no están claramente descritas involucran a peroxidasas, xantina oxidoreductasa y la familia de citocromo P450 (Lamattina *et al.*, 2003).

En una serie de experimentos realizados con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L. cv Grand Rapids), cuya germinación a temperaturas mayores de 25 °C es completamente dependiente de la luz, se ha determinado que éstas pueden germinar en oscuridad si son tratadas con ON (Beligni y Lamattina, 2000). Posteriormente, se observó que el ON es un regulador del proceso de muerte celular programada (PCD) dependiente de ácido giberélico (GA) que ocurre en células de aleurona de granos de cebada puestos a germinar. Este proceso es importante para la movilización de reservas y la nutrición del embrión en crecimiento (Beligni *et al.*, 2002). Estos resultados sugieren que el ON es un regulador de la germinación.

Recientemente se ha demostrado que el ON es un componente esencial en la cascada de señales dirigida por auxinas en la determinación de la arquitectura radical y el desarrollo de raíces adventicias que se forman cuando se escinde la raíz primaria. La señalización inducida por auxinas y mediada por ON que resulta en la formación de raíces adventicias comprende luego la activación de dos vías paralelas, una dependiente de GMP cíclico (cGMP) y la

otra, independiente de cGMP que involucra la activación de una cascada de señales en la que participan cinasas de proteínas activadas por mitógeno (MAPK) (Pagnussat *et al.*, 2002, 2003, 2004). Por otro lado se demostró que el ON puede inducir el desarrollo de raíces laterales en una vía independiente de auxinas y de este modo determinar el crecimiento y arquitectura del sistema radical en tomate (Correa-Aragunde *et al.*, 2004).

Por estudios de expresión global de genes en *A. thaliana* se ha determinado que el ON regula la expresión de numerosos genes. Esos genes codifican proteínas relacionadas para las respuestas de defensa, metabolismo, detoxificación celular, transporte, homeostasis de hierro, señalización, floración y biosíntesis (Parani *et al.*, 2004; Polverari *et al.*, 2003).

Así como se demostró que el ON es uno de los blancos potenciales de las auxinas para la formación de raíces adventicias, recientemente nuestro grupo encontró que también las alcanidas inducen la acumulación de ON en explantes de *Arabidopsis* (Campos-Cuevas *et al.*, 2008). Los niveles de ON se elevan al tratar explantes de tallo de *Arabidopsis* con *N*-isobutil-decanamida desde las 24 h posteriores a la aplicación del compuesto y esta acumulación se mantiene hasta 10 días posteriores, cuando se presenta una inducción de formación de raíces adventicias de hasta un 60%. Esto puede sugerir que las vías de señalización de las alcanidas, para regular diversos procesos morfogénicos, podrían utilizar al ON como un segundo mensajero.

El ácido salicílico y el ON son importantes reguladores de la respuesta contra organismos patógenos. Estudios citológicos muestran que las especies reactivas de oxígeno (ROS) y ON son producidas en el margen de las lesiones. Ambas señales regulan la acumulación de la otra y actúan conjuntamente en la regulación de la muerte celular en respuesta a patógenos. Resulta significativo que también ROS y ON colaboran en el cierre estomático inducido por la hormona vegetal ácido abscísico, sugiriendo que la interacción entre estas dos señales modula varias respuestas fisiológicas (Desikan *et al.*, 2004).

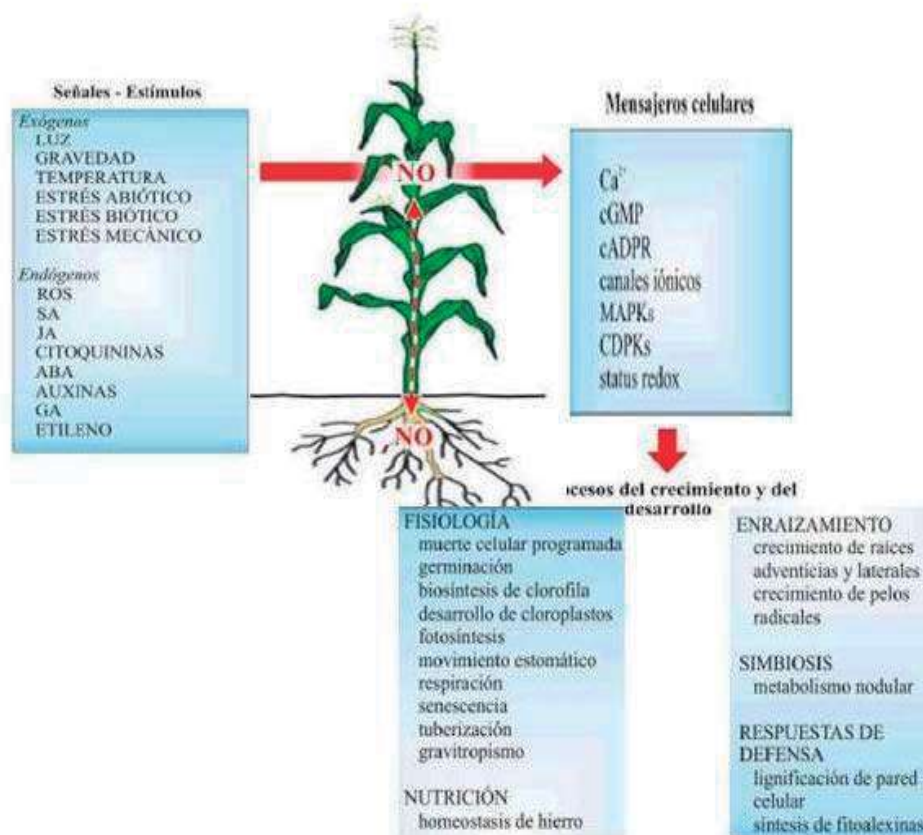


Figura 2. Procesos relacionados con el crecimiento, desarrollo y adaptación de las plantas donde interviene como regulador el óxido nítrico.

2.7. Glutamato.

El glutamato (Glu) o ácido glutámico es uno de los 20 aminoácidos constituyentes de las proteínas que posee un segundo grupo carboxilo (HOOC) en su cadena lateral. Este grupo se encuentra totalmente ionizado a pH fisiológico, por lo que el ácido glutámico se engloba dentro de los aminoácidos con grupos polares con carga negativa. Así mismo el Glu en animales también puede actuar como neurotransmisor en la sinapsis química que ocurre en las neuronas.

El Glu ocupa una posición central en el metabolismo de los aminoácidos en las planta. Este aminoácido se sintetiza por la acción de la enzima glutamato sintasa, utilizando la glutamina y 2-oxoglutarato. Sin embargo, el

glutamato es también el sustrato para la síntesis de la glutamina por la enzima glutamina sintasa. El grupo amino alfa del Glu también se puede transferir a otros aminoácidos por la acción de una amplia gama de aminotransferasas multiespecíficas. Finalmente, el Glu puede ser desaminado para formar amoníaco y 2-oxoglutarato. Actualmente se examina la posibilidad que las concentraciones celulares del Glu dentro de la planta sean reguladas por la acción combinada de estos caminos. Existen evidencias que sugieren que la función del Glu como señal en animales puede también ocurrir en el reino vegetal. La existencia en las plantas de los canales del Glu activados por el ión y su relación posible con la familia del gen GLR que es homólogo a los receptores ionotrópicos del Glu (iGluRs) presentes en animales se discuten. Se considera señalar al Glu desde una perspectiva evolutiva y de los papeles que puede desempeñar en las plantas que incluyen la regulación de la arquitectura radicular y la determinación de la capacidad de la raíz de responder a las fuentes de nitrógeno (N) orgánico en el suelo (Walch-Liu *et al.*, 2005).

El nitrato (NO_3^-) es la fuente principal de N para las plantas que crecen en suelos aerobios, siendo esta la forma inorgánica y el glutamato una de las formas orgánicas de N. Las raíces de muchas especies de plantas se sabe que utilizan el nitrógeno inorgánico, en la forma de NO_3^- , como señal para iniciar la proliferación localizada de la raíz dentro de partes del suelo ricas en N. Se ha observado que en concentraciones micromolares el Glu afecta el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis*. El L-glutamato se percibe específicamente en la cofia de la raíz e inhibe la actividad mitótica en el meristemo, pero no interfiere con la iniciación o el desarrollo de las raíces laterales (Walch-Liu y Forde *et al.*, 2006).

El efecto del L-glutamato es dosis dependiente, presentando un efecto de inhibición en el crecimiento de la raíz primaria de aproximadamente del 30% en la concentración de 20 μM y teniendo una inhibición mayor, de alrededor del 80% en concentraciones a partir de 100 μM . Estos efectos se presentan sin que el Glu pueda afectar el desarrollo del follaje o causar síntomas de toxicidad en la planta (Walch-Liu y Forde *et al.*, 2006). En este trabajo también se compararon las respuestas de diferentes líneas de *Arabidopsis* en la sensibilidad en concentraciones desde 50 μM a 1 mM de L-glutamato, siendo la línea C-24 la que mostró mayor sensibilidad de aproximadamente 80% de inhibición en 50 μM , mientras que la menos sensible fue la Niederzenz (RLD1),

teniendo una inhibición de 30% a una concentración de 1mM de L-glutamato (Walch-Liu *et al.*, 2006). Los efectos del glutamato sobre la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis* son similares a los observados por tratamientos con alcanidas, esto llevó a plantear la hipótesis de que ambos compuestos podrían interactuar para regular el desarrollo de las plantas. En un trabajo realizado en el grupo del Dr. Brian Forde de la Universidad de Lancaster, en Inglaterra, se aislaron mutantes de *Arabidopsis* resistentes a Glu (Forde *et al.*, resultados no publicados). En un trabajo en colaboración con nuestro grupo, el Dr. Forde proporcionó gentilmente estas mutantes para estudiar la respuesta a alcanidas.

Teniendo en cuenta los antecedentes anteriores nos hemos planteado la posibilidad de que las alcanidas, el L-glutamato y el ON poseen rutas de señalización convergentes a nivel molecular y fisiológico. Por lo tanto, este proyecto de investigación plantea el estudio de una posible interacción en la señalización de las alcanidas con el L-glutamato y el ON, caracterizando las respuestas de mutantes de *Arabidopsis* afectadas en la respuesta a L-glutamato a tratamientos con *N*-isobutil decanamida y estudiando los efectos de esta alcanida en la producción de óxido nítrico.

3. JUSTIFICACION.

Las alcamidas, el glutamato y el ON producen efectos similares en el desarrollo de la raíz, por lo tanto, es importante esclarecer una posible interacción entre las rutas de señalización de estos compuestos.

4. HIPOTESIS.

Las alcamidas, el L-glutamato y el ON alteran el crecimiento y desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana* mediante mecanismos de señalización comunes.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar los efectos de la *N*-isobutil decanamida, el L-glutamato y el óxido nítrico sobre el desarrollo de *Arabidopsis thaliana* y analizar posibles interacciones entre sus mecanismos de señalización.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

5.1. Comparar los efectos de la *N*-isobutil decanamida, el L-glutamato y el óxido nítrico sobre la arquitectura de la raíz de plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana*.

5.2. Estudiar los efectos de la *N*-isobutil decanamida, el L-glutamato y el óxido nítrico en el desarrollo de la raíz en mutantes de *Arabidopsis thaliana* resistentes a L-glutamato.

5.3. Caracterizar el efecto de la *N*-isobutil decanamida en la acumulación de óxido nítrico en la raíz de plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana*.

6. MATERIALES Y METODOS.

6.1. Material biológico.

Para llevar a cabo los diferentes diseños experimentales se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* de los ecotipos Col-0 y Ler, así como también 4 mutantes (*Colin*, *Freya*, *Guido* y *Daniel*) las cuales fueron proporcionadas por el Dr. Brian Forde, del Departamento de Ciencias Biológicas, Lancaster Environment Centre, Lancaster University, Lancaster LA1 4YQ, UK.

6.2. Preparación de las semillas.

Para realizar los bioensayos las semillas requieren de una desinfección previa. Las semillas se colocan en un tubo eppendorf, después se agregan 500 µL de etanol al 96% v/v y se someten a una agitación durante 5 min. Posteriormente se le retira el etanol y se le adiciona 800 µL de hipoclorito de sodio al 20% v/v, agitando por 7 min. Finalmente se retira el cloro y se realizan 5 lavados con agua destilada estéril. Todo este proceso se lleva a cabo en una campana de flujo laminar.

6.3. Condiciones de crecimiento.

Las semilla se siembran y se cultivan bajo condiciones de esterilidad en cajas de Petri con 30 ml de medio Murashige y Skoog (MS) 0.2x, el cual contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas y también contiene 0.6% de sacarosa y 1% de agar. El pH del medio se ajusta a 7.0 con hidróxido de potasio 0.1 N. Una vez preparado este se somete a esterilización en el autoclave (120 °C y 15 Lb de presión durante 15 min.). El medio MS contiene 2.0 mM NH_4NO_3 , 1.9 mM KNO_3 , 0.3mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.15 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 5µM H_3BO_3 , 0.1mM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.3 mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 µM $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1µM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.1 µM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 mM $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, (inositol (10 mg.L⁻¹) y Gly (0.2mg.L⁻¹).

La *N*-isobutil decanamida fue proporcionada por el Dr. Jorge Molina Torres del CINVESTAV, unidad Irapuato. La pureza de estos compuestos es mayor al 99 %, según se verifica por cromatografía de gases-masas (GC-MS) (Molina-Torres, Com. Per.). La *N*-isobutil decanamida se encuentra diluida en etanol absoluto, el SNP en DMSO y el L-glutamato en agua, por lo que a todos los controles se les añade el solvente respectivo en un volúmen equivalente a la concentración mas alta del compuesto en el bioensayo.

6.4. Variables de crecimiento y análisis de datos.

Las variables de crecimiento y desarrollo que se realizaron en los bioensayos fueron la longitud de la raíz primaria, el número de raíces laterales por planta y la densidad de raíces laterales según se indica en cada caso.

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

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

6.5. Análisis de la acumulación de óxido nítrico.

La acumulación de óxido nítrico en las plantas tratadas con SNP y *N*-isobutil decanamida se realizó sumergiendo el material en una solución 0.1 M Tris-HCL, pH 7.4, suplementada con el colorante fluorescente 4, 5-diacetato de diaminofluoresceína (DAF-2 DA, Sigma, USA) a concentración final de 10 μ M.

La detección se realizó mediante microscopía confocal utilizando un microscopio Olympus modelo BX50; Olympus, Japón). La fluorescencia se monitoreó con un láser argón azul con una línea de excitación desde 488 a 568 nm y una ventana de emisión desde 585 a 610 nm.

7. RESULTADOS Y DISCUSION.

7.1. Efecto del L-Glutamato sobre la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

El glutamato es un aminoácido muy importante para el metabolismo de las plantas. Se le considera como una molécula señal conservada en grupos de organismos diversos. En las plantas se le ha relacionado con la capacidad de la raíz de responder a las fuentes de N orgánico del suelo.

Para evaluar los efectos del glutamato en el desarrollo de la raíz, se realizaron bioensayos in Vitro, evaluando las respuestas de arquitectura de la raíz de dos ecotipos de *Arabidopsis* (Col-0 y Ler) en diferentes tratamientos con este aminoácido. La actividad biológica de este compuesto sobre el crecimiento de la raíz se observa en la fig. 3A, en donde se aprecia la disminución en la longitud de la raíz primaria de plantas de los dos ecotipos utilizados, de manera constante al aumentar la concentración de glutamato. Las plantas del ecotipo Ler, mostraron una mayor sensibilidad con una inhibición de aproximadamente el 50% en el crecimiento de la raíz primaria en la concentración de 200 μ M, mientras que las plantas del ecotipo Col-0 mostraron entre un 10 a 15 % de inhibición.

Así también, los tratamientos con glutamato incrementan el número de raíces laterales por planta de manera dependiente a las concentraciones, mostrando mayor número las plantas del ecotipo Ler (Fig. 3B). La densidad de raíces laterales registró un aumento de hasta 4 veces en las concentraciones de glutamato más altas en comparación con las plantas creciendo sin glutamato.

De esta forma, es evidente como el L-glutamato en concentraciones superiores a 50 μM modifica la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*, inhibiendo el crecimiento de la raíz primaria y promoviendo la formación de raíces laterales.

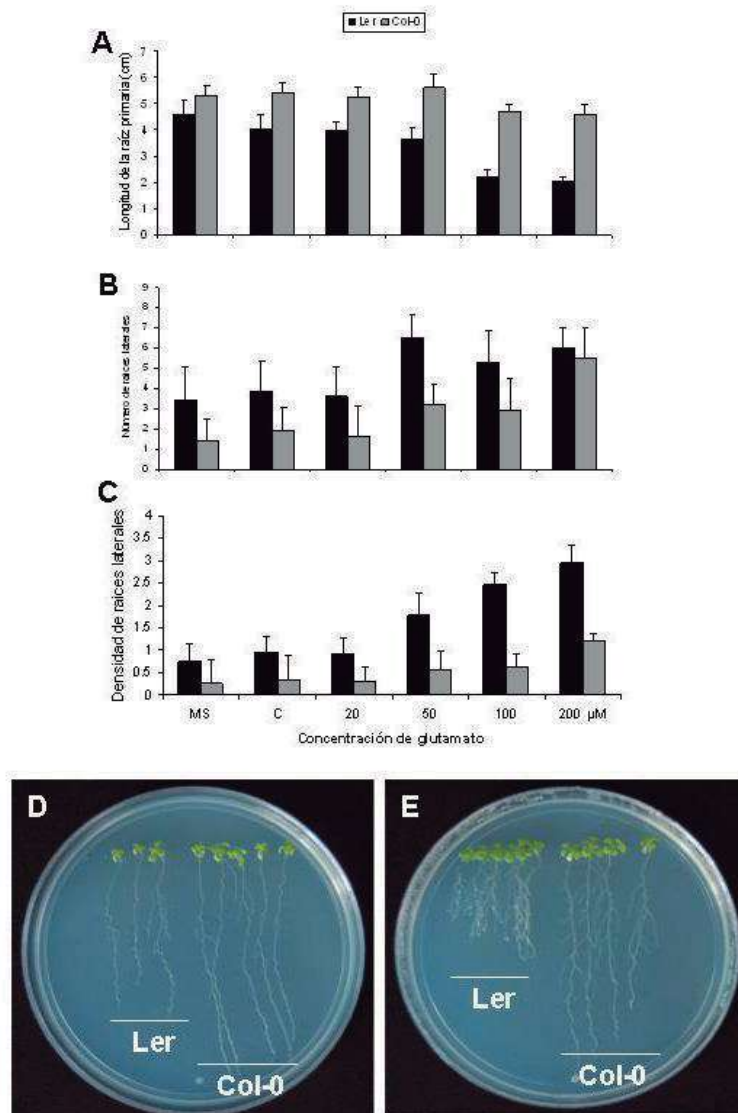


Figura 3. Efecto del L-glutamato sobre la arquitectura de la raíz de *A. thaliana* a los 10 días después de la germinación. A) Longitud de la raíz primaria. B) Número de raíces laterales por planta. C) Densidad de raíces laterales. D-E) Efecto visual sobre el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana*. D) Plántulas creciendo en medio sin glutamato. (E) Plántulas creciendo en medio con glutamato (200 μM).

7.2. Efecto del L-glutamato sobre el crecimiento de plantas silvestres y mutantes resistentes a L-glutamato en ensayos de transferencia.

Uno de los diseños experimentales para determinar la resistencia o susceptibilidad de una planta hacia cierto compuesto eliminando variables como el retardo y desfase de la germinación, es mediante la transferencia, en el cual se germinan y crecen plantas en medio sin el compuesto para en etapas posteriores del desarrollo, realizar la transferencia de las plantas a medios adicionados con el compuesto a probar. Para estudiar los efectos del L-glutamato en plantas de *Arabidopsis* y en las mutantes proporcionadas por el Dr. Brian Forde, se sembraron semillas silvestres (Ler) y las mutantes (*Freya*, *Daniel*, *Guido* y *Colin*) en medio MS 0.2x (sin L-glutamato) e incubadas para su crecimiento durante 3 días, posteriormente las plántulas fueron transferidas a medio sin y con L-glutamato a una concentración de 250 μ M. Se cuantificó el crecimiento de la raíz primaria a los 12 días posteriores a la transferencia. En la cinética de crecimiento que se presenta en la Fig. 4, se puede observar, al compararse con su control, que las mutantes efectivamente son resistentes a L-glutamato, ya que muestran un crecimiento constante en medio sin glutamato, de manera similar a lo observado en condiciones libres de L-glutamato, es decir, las mutantes son incapaces de percibir la presencia del L-glutamato en el medio, caso contrario pasa con las plantas silvestres, que al estar en medio sin L-glutamato tienen un crecimiento normal, mientras que al estar presente la molécula presentan una inhibición de la elongación de la raíz primaria casi desde el día 2 y total a partir del día 6 (Fig. 4A-D). Observando detalladamente se aprecia que la mutante con mayor sensibilidad a L-glutamato es *Guido* al presentar menor crecimiento en su raíz primaria en medio suplementado con el compuesto (Fig. 4C).

Estos resultados sugieren que la correcta percepción del L-glutamato es importante para el crecimiento de la raíz primaria y que las mutantes confieren resistencia al suministro del compuesto.

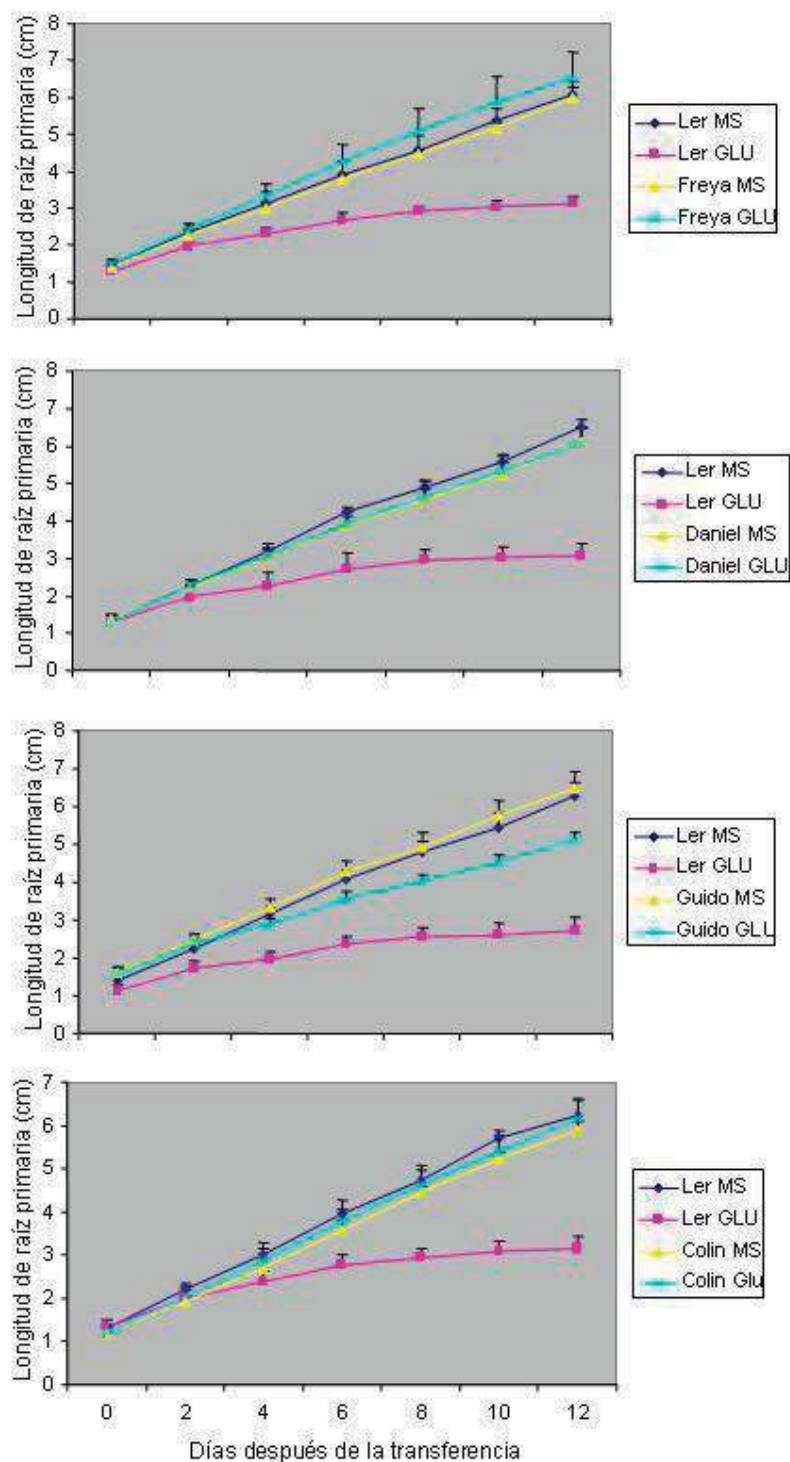


Figura 4. Efecto del L-glutamato sobre el crecimiento de la raíz primaria en plantas silvestres (Ler) y las mutantes resistentes a glutamato. Las plantas fueron crecidas por 3 días en medio MS 0.2x y después transferidas a medio con y sin L-glutamato. A) Cinética de crecimiento para la mutante *Freya*. B) Cinética de crecimiento para la mutante *Daniel*. C) Cinética de crecimiento para la mutante *Guido*. D) Cinética de crecimiento para la mutante *Colin*.

En la figura 5 se muestran fotografías de placas representativas de plantas de 12 días después de la transferencia a una concentración de 250 μ M de L-glutamato. En el control se observa una raíz larga con crecimiento pivotante y una formación normal de raíces laterales, tanto en las silvestres como en las mutantes, mientras que en las plantas crecidas en presencia con L-glutamato las plantas silvestres inhiben el crecimiento de la raíz primaria, caso contrario a las mutantes que no muestran afectado su arquitectura por efecto de la molécula, manteniendo su crecimiento sin alteración alguna; entre las mutantes existe variación en la sensibilidad al compuesto, la menos insensible por la longitud de su raíz primaria es *Guido*, mientras que, las mas insensibles o resistentes son *Daniel* y *Freya*.

En la figura 6. Se muestran los efectos del L-glutamato en la formación de raíces laterales, el número es mayor en las silvestres que en las mutantes, sin embargo, la mutante *Guido* tiene ligeramente más que el resto de mutantes, confirmando el efecto de sensibilidad al compuesto observado en el crecimiento de la raíz primaria. La mutante *Daniel* presentó el mismo número de raíces laterales en presencia o ausencia de L-glutamato (Fig. 6A); un efecto semejante y consecuente se aprecia en la longitud de las raíces laterales, la silvestre presentó la mayor longitud en sus raíces laterales, la mutante de mayor longitud en sus raíces laterales (Fig. 6B) y mayor densidad de raíces laterales (Fig. 6C) es *Guido*, en tanto que la mutante con mayor resistencia es *Daniel*.

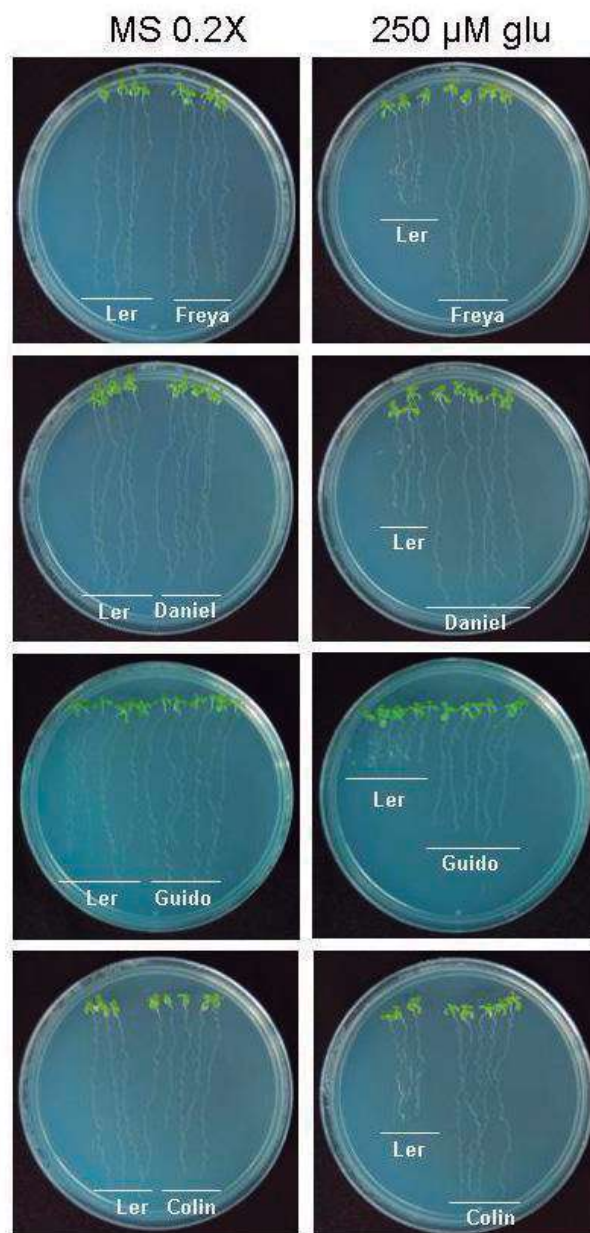


Figura 5. Fotografías del efecto del L-glutamato sobre el crecimiento y desarrollo de plantas silvestres y mutantes, 12 días después de la transferencia a medio sin glutamato o con una concentración de 250 μ M de este compuesto.

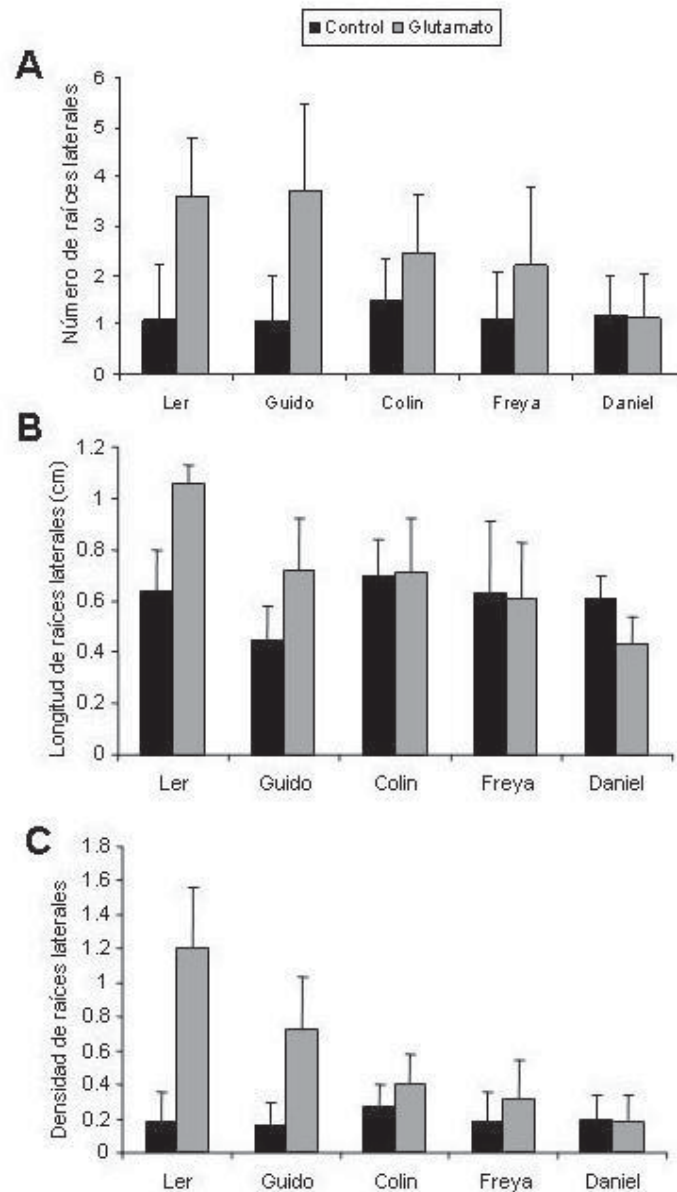


Figura 6. Efecto del L-glutamato sobre la arquitectura de la raíz de plantas silvestres y mutantes a los 12 días después de la transferencia a medio sin glutamato o con L-glutamato 250 μ M. A) Número de raíces laterales. B) Longitud de raíces laterales. C) Densidad de las raíces laterales.

7.3. Efecto del L-glutamato en el crecimiento de plantas silvestres y mutantes afectadas en la respuesta a L-glutamato por ensayos de germinación.

Posteriormente al experimento de transferencia se diseñó un segundo experimento para evaluar los efectos del glutamato en plantas silvestres y mutantes que fueron germinadas y crecidas en presencia de este compuesto. Este experimento consistió en sembrar la semilla directamente en los medios sin glutamato o suplementado con una concentración de L-glutamato de 200 μ M. En la figura 7 se observa el efecto del L-glutamato en la arquitectura de la raíz de plantas silvestres y mutantes, donde se muestra que el compuesto inhibe el crecimiento de la raíz principal en plantas silvestres, pero no en las mutantes (Fig. 7A). El tratamiento con glutamato aumentó el número de raíces laterales y la densidad de las raíces laterales en las plantas silvestres, en tanto que en las mutantes, considerando la densidad de raíces laterales, los efectos del glutamato fueron menos claros. En particular la mutante *Guido* presentó la mayor formación de raíces laterales y la mayor densidad de éstas en medio con L-glutamato (Fig. 7B y C).

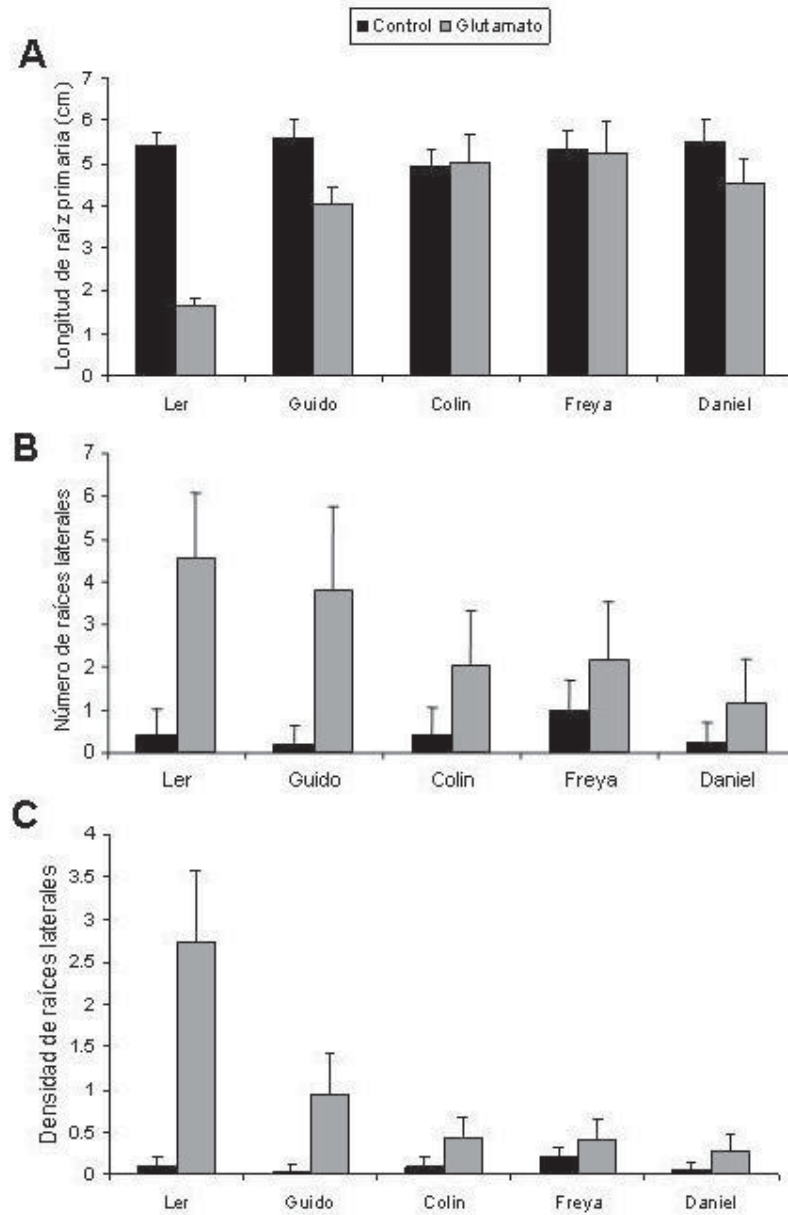


Figura 7. Efecto del L-glutamato sobre la arquitectura de la raíz de plantas silvestres y mutantes a los 13 días después de la germinación creciendo en medio sin glutamato o con 200 μ M L-glutamato. A) Longitud de raíz primaria. B) Número de raíces laterales. C) Densidad de raíces laterales.

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

La *N*-isobutil decanamida es una alcanamida saturada que se obtiene por reducción catalítica de la afinina (que posee dos insaturaciones). Este es el compuesto con mayor actividad biológica para regular diferentes procesos del desarrollo de la raíz que incluyen la formación de pelos radiculares, el crecimiento de la raíz primaria y la formación de callos en hojas (López-Bucio *et al.*, 2007). Para validar la actividad biológica de la *N*-isobutil decanamida y comparar sus efectos con el L-glutamato, se realizaron bioensayos in Vitro analizando los efectos de este compuesto sobre la arquitectura de la raíz de *A. thaliana*.

La actividad biológica de este compuesto sobre el crecimiento de la raíz primaria se observa en la fig. 8, en donde se aprecia la disminución en la longitud de la raíz de manera dosis-dependiente respecto de la concentración de la *N*-isobutil-decanamida (Fig. 8A), que va desde una inhibición del 10% en una concentración de 16 μ M, hasta una inhibición del 90% en plantas crecidas en la concentración de 64 μ M (Fig. 8A). Así también, los tratamientos con *N*-isobutil decanamida incrementan el número de raíces laterales por planta (Fig. 8B). De esta forma, es evidente que la *N*-isobutil decanamida es una molécula que inhibe el crecimiento de la raíz primaria y estimula la formación de raíces laterales, de manera similar a lo observado con L-glutamato.

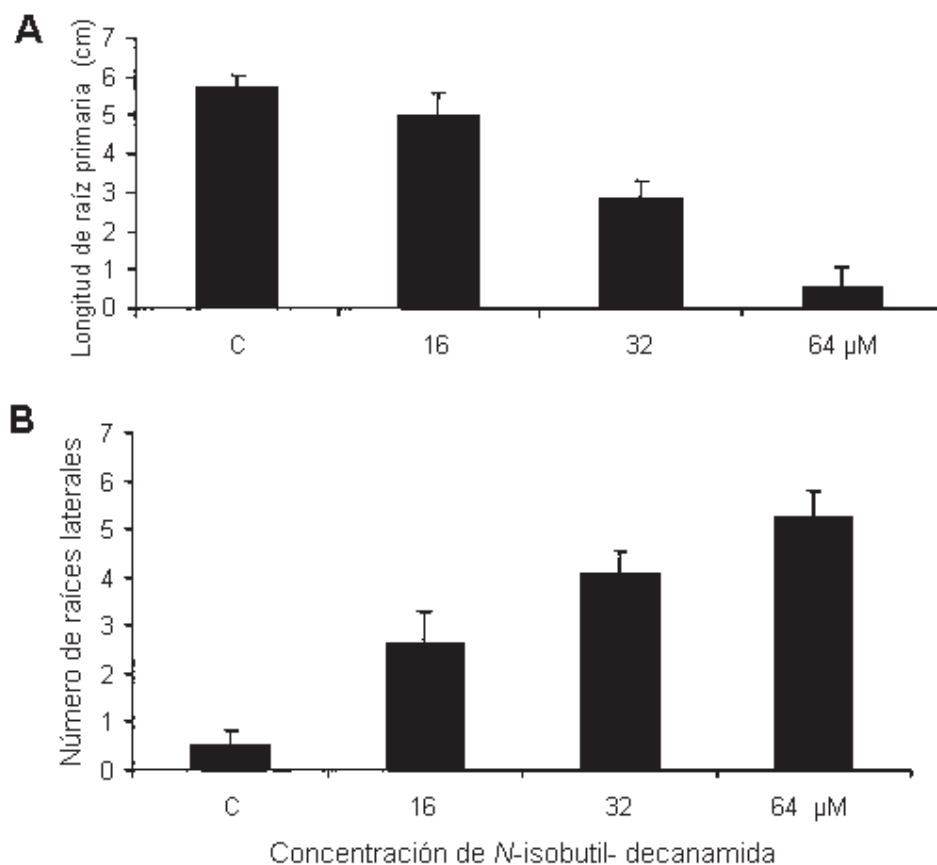


Figura 8. Efecto de la *N*-isobutil decanamida sobre la arquitectura de la raíz de plantas de *A. thaliana* de 10 días después de la germinación. A) Longitud de la raíz primaria. B) Número de raíces laterales.

7.5. Efecto de la *N*- isobutil decanamida sobre la arquitectura de la raíz en mutantes afectadas en la respuesta a L-glutamato.

Para esclarecer una posible interacción entre la señalización por alcanamidas y la de glutamato, las mutantes resistentes a L-glutamato se sometieron a tratamientos con *N*-isobutil decanamida. En la figura 9 se muestran los efectos de la *N*- isobutil decanamida sobre la arquitectura de la raíz de las mutantes resistentes a L-glutamato y sus controles. Se observa claramente la inhibición del crecimiento de la raíz primaria, desde un 70% en la concentración de 24 μM, hasta una inhibición del 80% en 48 μM (Fig. 9A).

De la misma forma, los tratamientos con *N*-isobutil decanamida aumentaron el número de raíces laterales por planta alcanzado su máximo efecto en la concentración de 24 μ M (Fig. 9B). La densidad de raíces laterales se incrementa conforme aumenta la concentración del compuesto, siendo de 10 a 12 veces mayor en las dos concentraciones probadas (Fig. 9C). La similitud en las respuestas de las plantas silvestres y las mutantes resistentes a glutamato a la *N*- isobutil decanamida, permite concluir que las rutas de señalización de L-glutamato y de la *N*- isobutil decanamida son independientes.

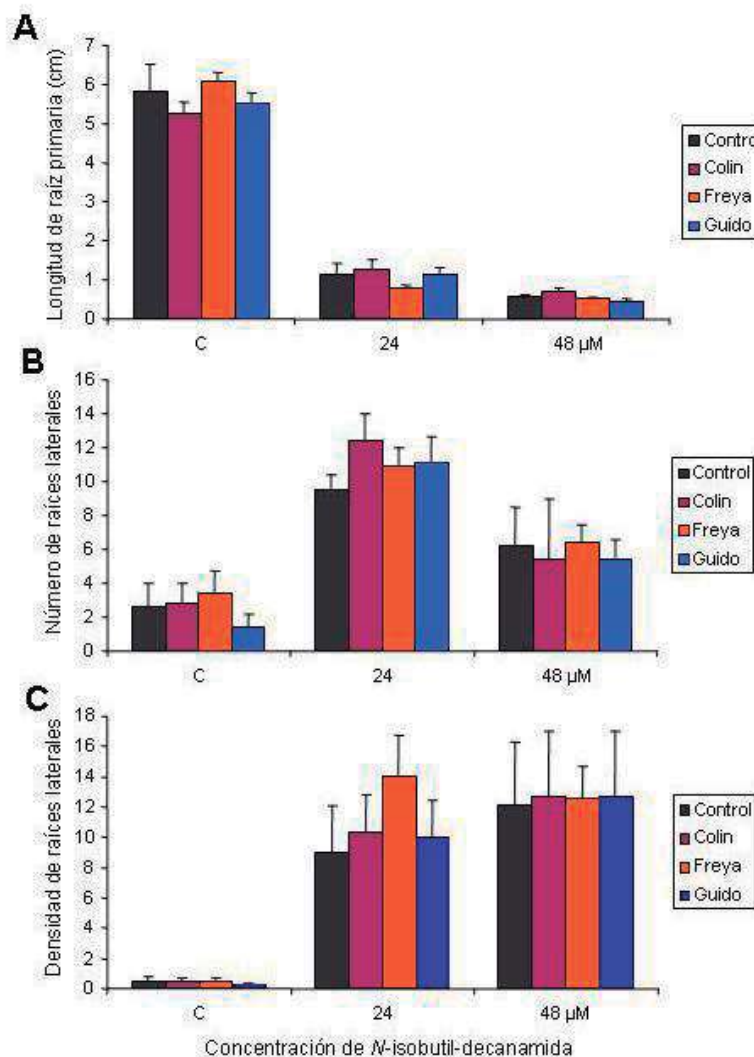


Figura 9. Efecto de la *N*- isobutil decanamida sobre la arquitectura de la raíz en plantas silvestres y en mutantes resistentes a L-glutamato a los 10 días después de la germinación. A) Longitud de la raíz primaria. B) Número de raíces laterales. C) Densidad de raíces laterales.

7.6. Efecto del óxido nítrico sobre la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

Muchos de los avances en el conocimiento que se tiene sobre las funciones del ON, su síntesis y señalización, se han logrado en base a estudios farmacológicos en los que son utilizados atrapadores y donadores de ON, e inhibidores enzimáticos de la ON sintasa. Un donador frecuentemente empleado para estos fines es el nitropúsido de sodio (SNP) (Nigel y Fang *et al.*, 2005).

Para determinar el nivel y las concentraciones en las cuales el SNP actúa sobre el desarrollo de plántulas de *A. thaliana*, se realizó una curva de crecimiento, en la que se cuantificó la longitud de la raíz primaria en los diferentes tratamientos, observándose una inhibición dependiente de la concentración del SNP de hasta 50% en 20 μM y de 75% en la concentración de 30 μM (Fig. 10A).

Al cuantificar el número de raíces laterales se obtuvo un incremento con respecto al control, teniendo una mayor estimulación en la concentración de 10 μM , de casi 4 veces más que el control (Fig. 10B). A partir de esta concentración el número de raíces laterales disminuye conforme se aumenta la concentración.

En cuanto a la densidad de las raíces laterales, el efecto del SNP también es dependiente a la concentración, ya que conforme ésta se incrementa, la densidad también lo hace (Fig. 10C). Estos resultados indican que el SNP regula la arquitectura del sistema radical de una manera dependiente de la concentración, inhibiendo el crecimiento de la raíz primaria y estimulando la formación de raíces laterales.

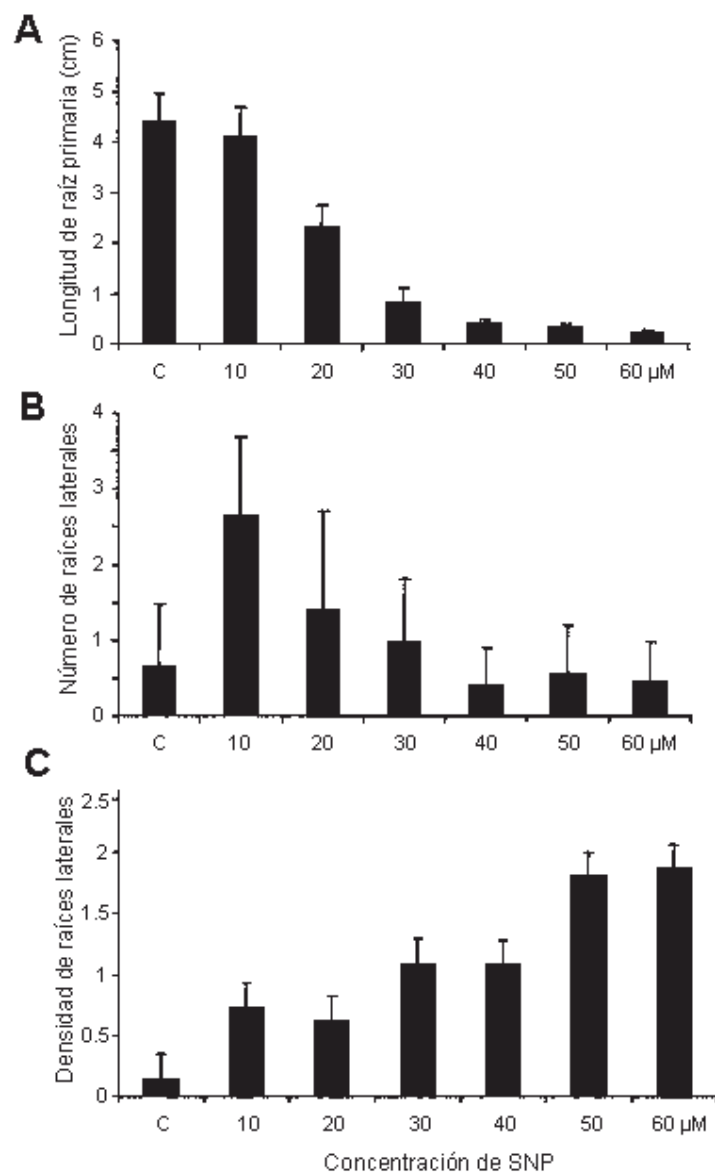


Figura 10. Efecto del SNP sobre la arquitectura de la raíz de *A. thaliana* en plantas del ecotipo Col-0 a los 8 días después de la germinación. A) Longitud de la raíz primaria. B) Número de raíces laterales C) Densidad de raíces laterales.

7.7. Efecto del SNP en la acumulación de óxido nítrico en *A. thaliana*.

Los efectos del SNP en la regulación del desarrollo de la raíz podrían estar relacionados a la acumulación endógena de ON. Para investigar en que partes de la raíz ocurre la mayor acumulación de ON en respuesta al tratamiento con SNP, se realizaron análisis de acumulación de ON por microscopía confocal en plantas silvestres de *Arabidopsis* que fueron crecidas por 10 días en medio MS0.2X con diferente concentración de SNP.

En la figura 11 se muestran fotografías de la expresión del ON en medios con SNP a diferentes concentraciones, este molécula indujo la acumulación de ON principalmente en el meristemo de la raíz primaria (Fig. 11 A,C,E y G), mientras que en raíces laterales maduras, esta acumulación ocurre en la zona de elongación (Fig.11H). Este aumento de ON se incrementa conforme se eleva la concentración de SNP.

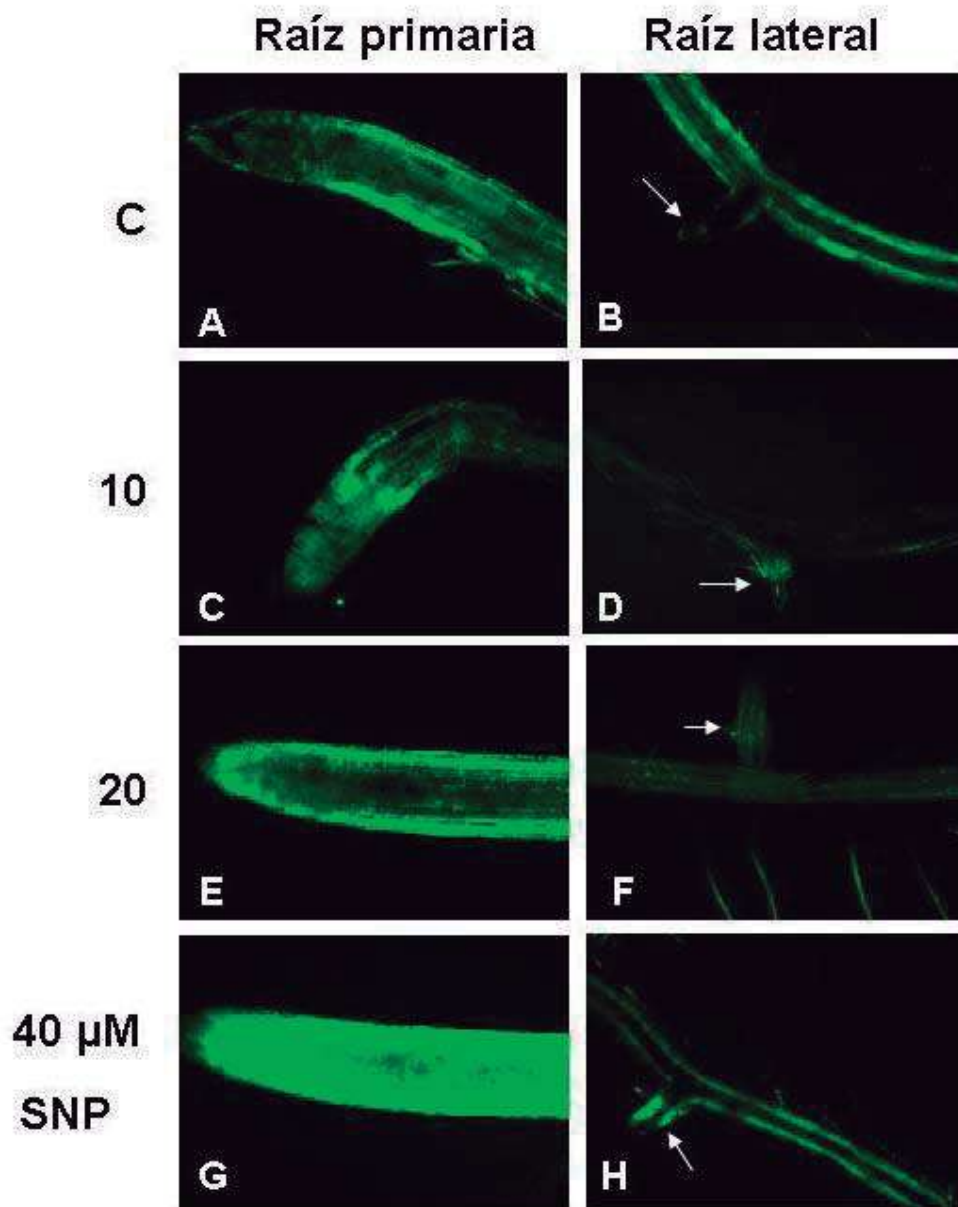


Figura 11. Acumulación de óxido nítrico en plantas de *Arabidopsis thaliana* crecidas bajo diferentes concentraciones de SNP a los 10 d.d.g. A,C,E,G) Meristemo de la raíz primaria. B,D,F,G) Raíces laterales. Se muestra la fluorescencia del colorante DAF-2DA detectada por microscopía confocal.

7.8. Efecto del SNP sobre la arquitectura de la raíz en mutantes afectadas a la respuesta de L-glutamato.

El glutamato y el óxido nítrico (NO) son importantes mensajeros celulares en los seres vivos. Ambos compuestos, al ser aplicados exógenamente, regulan el desarrollo de la raíz, indicando una interacción potencial entre esas moléculas en la transducción de señales en plantas (Walch-Liu *et al.*, 2006; Pagnussat *et al.*, 2002).

En la figura 12 se presentan los efectos del SNP sobre la arquitectura de la raíz en mutantes de *Arabidopsis* resistentes a glutamato, en donde se aprecia la disminución en la longitud de la raíz de manera constante al aumentar la concentración de SNP (Fig. 12A) que va desde una inhibición de alrededor del 50% en la concentración de 20 μ M, hasta una inhibición del 80% en las plantas crecidas en la concentración de 40 μ M (Fig. 12A). Por otra parte, cuantificando el número de raíces laterales se observa que el efecto del SNP es variable para cada una de las líneas, incrementado el número en la silvestre respecto a su control, mientras que en la mayoría de las mutantes lo reduce, como sucede con las mutantes *Freya* y *Colin* (Fig. 12B). Los tratamientos con este compuesto aumentaron la densidad de raíces laterales, tanto en plantas silvestres como en las mutantes, principalmente en la concentración de 20 μ M (Fig. 12C). Estos resultados sugieren que el glutamato y el ON actúan de manera independiente en la regulación de la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis*.

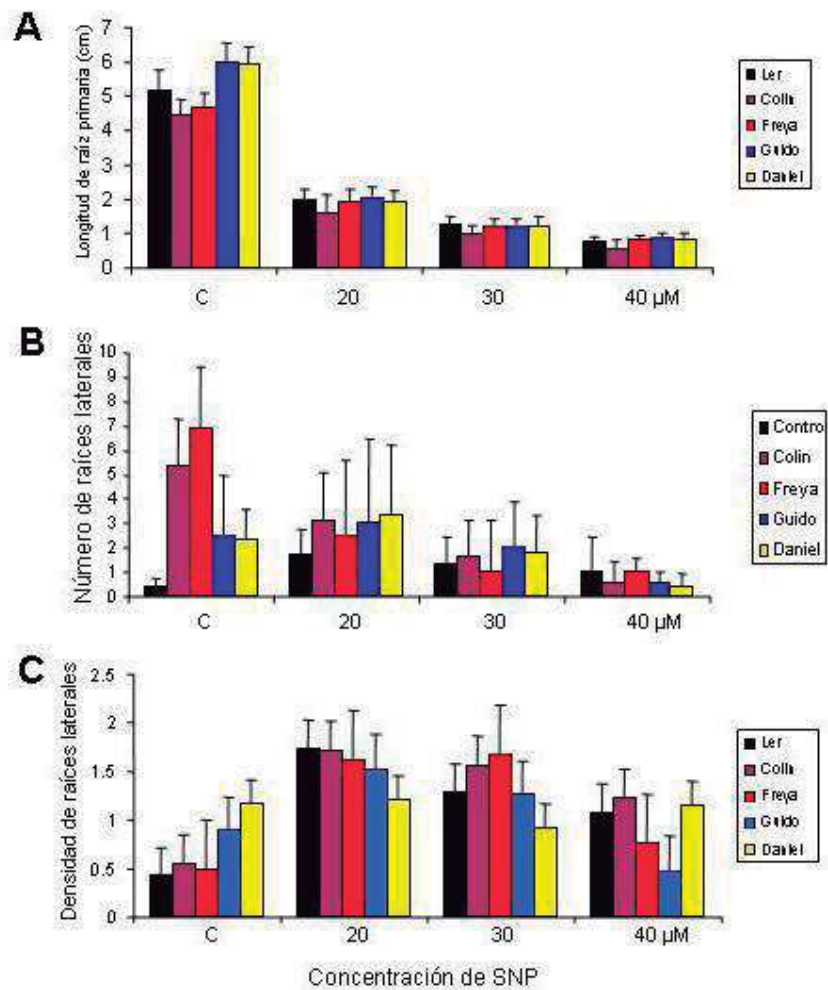


Figura 12. Efecto del SNP en la arquitectura de la raíz de plantas silvestres (Ler) y mutantes resistentes a L-glutamato de *Arabidopsis* a los 10 días después de la germinación. A) Longitud de la raíz primaria. B) Número de raíces laterales. C) Densidad de raíces laterales.

7.9. Efecto de la *N*- isobutil decanamida en la acumulación de óxido nítrico en *A. thaliana*.

Las raíces laterales y adventicias se forman en procesos del desarrollo postembrionarios, las raíces laterales se forman por la reactivación del ciclo celular de células del periciclo de la raíz, pero los mecanismos por los cuales se forman las raíces adventicias aún no han sido bien esclarecidos. Ambos procesos son regulados por la adición exógena de alcaloides (López-Bucio *et al.*, 2007; Campos-Cuevas *et al.*, 2008), o por el aumento en la concentración endógena de óxido nítrico (Pagnusat *et al.*, 2002). Para investigar si el tratamiento con *N*-isobutil decanamida pudiera alterar la producción de ON, se realizaron bioensayos de dosis-respuesta con plántulas de *Arabidopsis* crecidas bajo diferentes concentraciones de la alcaloide y se detectaron los niveles de ON adicionando DAF2, un fluorocromo que reacciona con el ON y emite una señal fluorescente que puede ser detectada por microscopía confocal. En la figura 13 se muestran fotografías de la acumulación de ON en plántulas crecidas en medio sin *N*-isobutil decanamida o suplementado con diferentes concentraciones de esta alcaloide. Se observa que el ON se acumula en diferentes partes de la raíz de *A. thaliana*, incluyendo la raíz primaria y las raíces laterales (Fig. 13 A-H).

Se puede observar que el ON se acumula en la epidermis de raíces primaria y laterales, y en la región de elongación de la raíz primaria de *Arabidopsis* (Fig. 13A). Esta acumulación aumenta con el incremento en la concentración de *N*-isobutil-decanamida (Fig. 13B-H), especialmente en las zonas de formación de raíces laterales y de pelos radiculares y en la región meristemática a partir de concentraciones de *N*-isobutil-decanamida de 32 μ M. Esto indica que la presencia de alcaloides estimula la síntesis de ON en la raíz, pudiendo las vías de señalización de estas moléculas interactuar directamente en la regulación del desarrollo y crecimiento de las plantas.

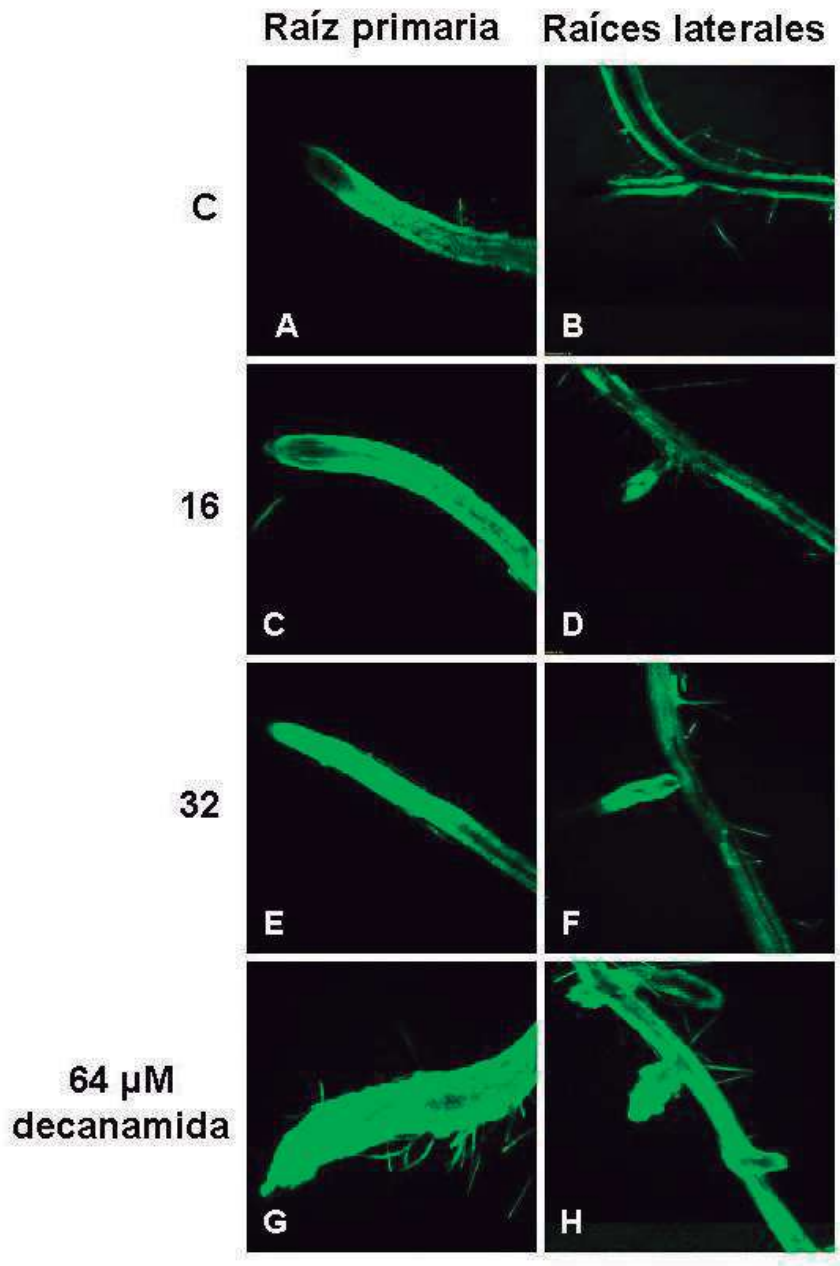


Figura 13. Acumulación de óxido nítrico en plantas de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a diferentes concentraciones de *N*-isobutil decanamida a los 10 d.d.g. A,C,E,G) Meristemo de la raíz primaria. B,D,F,G) Raíces laterales. Se muestra la fluorescencia del colorante DAF-2DA.

El efecto de los tratamientos con *N*-isobutil decanamida sobre la acumulación de ON es similar al observado con SNP, sugiriendo que posiblemente las alcanidas funcionen como donadores de ON, o induzcan su acumulación regulando las vías relacionadas con su síntesis. Es por ello que es importante conocer las probables interacciones de sus rutas de señalización a nivel genético, mediante la identificación de mutantes resistentes a ON o por el estudio de la respuesta a SNP de mutantes resistentes a alcanidas a través de bioensayos farmacológicos similares a los aquí empleados.

8. CONCLUSIONES.

Los resultados derivados de este trabajo sugieren que aunque los efectos biológicos de las alcanidas y el glutamato son muy similares, inhibiendo el crecimiento de la raíz primaria y estimulando la formación de raíces laterales, las rutas de señalización entre estos compuestos son independientes. El estudio de la respuesta a SNP de mutantes resistentes a glutamato, indica que el ON y el glutamato también actúan por mecanismos independientes en la regulación de la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis*. La acumulación de ON en diferentes regiones de la raíz por tratamientos con *N*-isobutil decanamida, sugiere que las alcanidas podrían regular el desarrollo de las plantas a través de la acumulación de NO. En este escenario el ON podría actuar como un mensajero intracelular en la señalización por alcanidas.

9. LITERATURA CITADA

Beligni M. V., and Lamattina L. (2000). Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyls elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta*. 210:215-221.

Beligni MV, Fath, A, Bethke PC, Lamattina L, Jones RL (2002). Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. *Plant Physiol*. 129: 1642-1650.

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

Capman K.D. (2004). Occurrence, metabolism, and prospective functions of *N*-acylethanolamines in plants. *Prog. Lipid Res*. 43:302-327.

Correa-Aragunde N., Graziano M., Chevaller C., Lamattina L. (2006). Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. *Journal of Experimental Botany*. 57:581-588.

Correa-Aragunde N., Graziano M., Chevaller C., Lamattina L. (2004). Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta*. 218:900-905.

Del Pozo J.C., López-Mata M., Ramírez-Parra E., Gutierrez C. (2005). Hormonal control of the plant cell cycle. *Physiologia Plantarum*. 123:173-183.

Desikan R., Cheung M.K., Brigh J., (2004). ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cell. *J Exp Bot* 55:205-212.

García-Chávez A., Ramírez-Chávez E., Molina-Torres J. (2004). El género *Heliopsis* (*Helianthea*; *Asteraceae*) en México y las alcanidas presentes en sus raíces. *Acta Botánica Mexicana*. 69:115-131.

Gray W.M. (2004). Hormonal regulation of plant growth and development. *PLos Biology*. 2:12701273.

Himanen K., Boucheron E., Vanneste S., de Almerida Angler J., Inzé D. y Beechman T. (2002). Auxin –Mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant cell*. 14:2339-2351.

Ignarro L. J., Byrns R.E., Buga G. M and Wood K. S. (1987). Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacological and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ. Res*. 61:866-879.

Kanbe K.H., Naganawa M., Okamura T., Sasaki M., Hamada Y., Okami T., Takeuchi (1993). Amidenin, a new plant growth-regulating substance isolated from *Amycolatopsis sp*, *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 57:1261-1263.

Lamattina L, García-Mata C, Graziano M, Pagnussat G (2003). Nitric Oxide: The Versatility of an Extensive Signal Molecule. *Annual Review Plant Biology* 54: 109-136.

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

López-Bucio J., Millán-Godínez M., Méndez-Bravo A., Morquecho-Contreras A., Ramírez-Chávez E., Molina-Torres J., Pérez-Torres A., Higuchi M., Kakimoto T., Herrera-Estrella L. (2007). Cytokinin receptors are involved in alkamide regulation of root and shoot development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 145: 1703-1713.

Molina-Torres J., y García-Chávez A., (2001) Alcamidas en plantas: Distribución e importancia. *Avance y Perspectiva*.

Molina-Torres J., Salgado-Garciglia R., Ramírez-Chávez E., del Río R. (1996). Purely oleofenic alkamides in *Heliopsis longipes* and *acmella* (*Sphilanthes oppositifolia*). *Biochem Syst Ecol*. 24:43-47.

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

Norberg M., Holmlund M. y Nilsson O. (2005). The BLADE ON PETIOLE genes act redundantly to control the growth and development of lateral organs. *Development*. 132:2203:2213.

Oakenfull, E. A., riou-Dhamlichi C. y Murray J. A. H. (2002). Plant D-type cyclins and the control of G1 progression. *Phil. Trans. Soc. Lond*. 357:749-760.

Pagnussat G. C., Lanteri M. L., and Lamattina L. (2003). Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiol*. 132:1241-1248.

Pagnussat G. C., Simontacchi M., Pantarulo S. y Lamattina L. (2002). Nitric Oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol*. 129:954-956.

Parani M., Rudrabhatla S., Myer R., Weirich H., Smith B., Leaman D.W. and Goldamn S. (2004). Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol. Journal*. 7: 359-366.

Polerari A., Molesini B., Pezzotti M., Buonauro R., Marte M., and Delledonne M- (2003). Nitric oxide-mediated transcriptional changes in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 16:1094-1105.

Raduner S., Mejewska A., Chen J. Z., Xie X. Q., Hamon J., Faller B., Altmann K. H., y Gertsch J. (2006). Alkylamides from *Echinacea* are a new class of cannabinomimetics. *J. Biol. Chem.* 281:14192-14206.

Ramírez-Chávez E., López-Bucio J., Herrera-Estrella L., Molina-Torres J. (2004). Alkamides isolated from plants promote growth and alter root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134: 1058-1068.

Scheres B., y Wolkenfelt H., (1998). The *Arabidopsis* root as a model to study plant development. *Plant Physiol. Biochem.* 36:21:32.

Walch-Liu P., Liu L. Remans T, Tester M, y Forde B.G. (2006). Evidence that L-Glutamate can act as an exogenous signal to modulate root growth and branching in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 47:1054-1057.

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