



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-
BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

“Caracterización de los efectos de la serotonina sobre la arquitectura de la raíz y la respuesta a auxinas en *Arabidopsis thaliana*”

Tesis que presenta

Q.F.B. Ramón Pelagio Flores

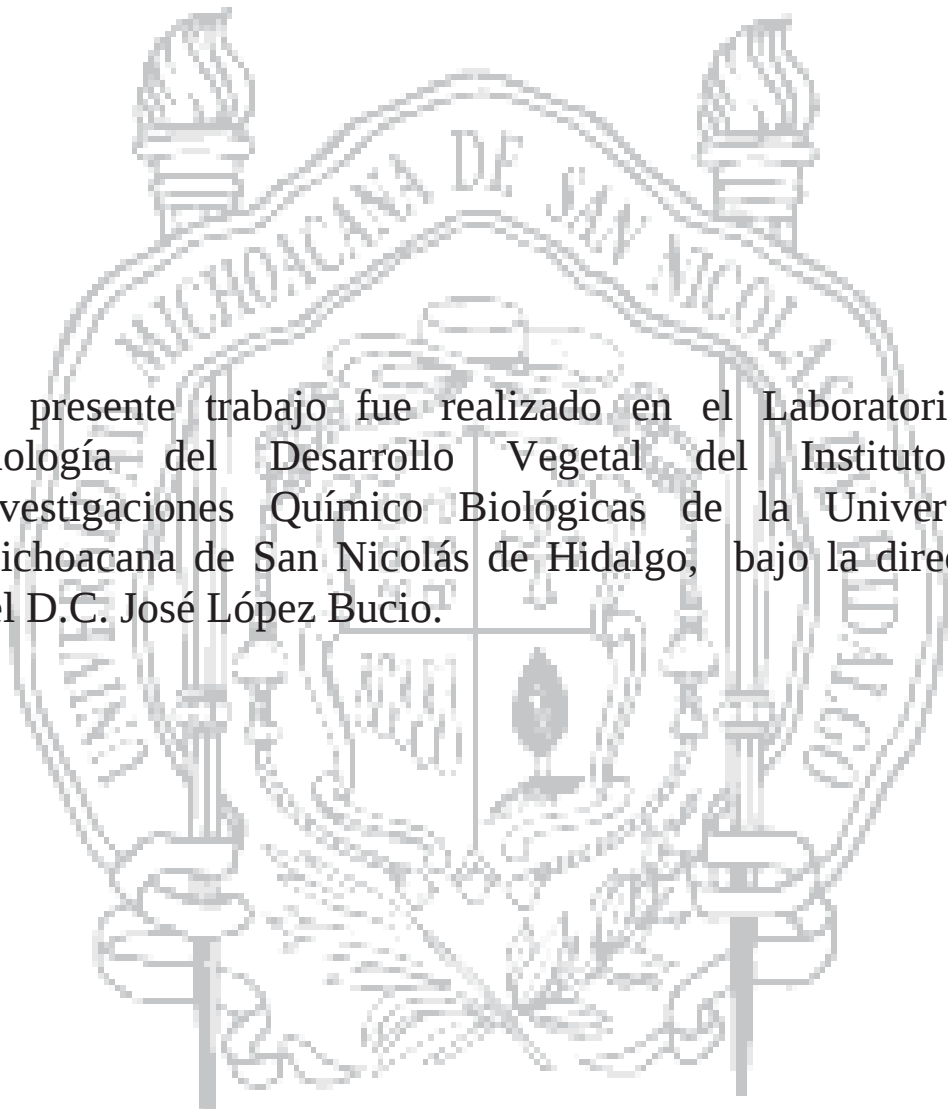
Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias
en
Biología Experimental

Director de Tesis

D.C. José López Bucio

Morelia, Michoacán, México.

Febrero 2011.



El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección del D.C. José López Bucio.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, **Ramón Pelagio Urrutia** y **Gloria Flores Rivera** por todo su amor, apoyo incondicional, consejos, confianza y ejemplo de vida. Los amo y siempre estaré orgulloso de ustedes.

A mis hermanos **Chelo, Gélica, Manolo, Gonza, Carlos, Licha** y **Pepe**, por todo el amor amistad y apoyo incondicional que siempre me han brindado todos y en todo momento, además de los incontables momentos de felicidad que hemos compartido.

Al **D.C. José López Bucio** a quien respeto y admiro, por darme la confianza y oportunidad de continuar con mi formación académica, por compartirme sus conocimientos, por todo el apoyo, interés y dedicación brindada, así como por todas las magnificas enseñanzas académicas y humanas que me ha dejado el trabajar con el durante ya varios años.

A la **D.C. Lourdes Macías Rodríguez** y al **D.C. Josué Altamirano Hernández** por su confianza, apoyo, consejos y disponibilidad de ayudar siempre que se requirió durante en la realización de este trabajo.

Al los **D.C. Eduardo Valencia Cantero, D.C. Salvador Manzo Avalos, D.C. Elda Beltrán Peña** y **D.C. Lourdes Macias Rodríguez** por acceder amablemente a ser parte de mi comité de evaluación por sus comentarios y sugerencias en la revisión de este trabajo de tesis.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: **Alejandro, Alina, Amira, Aron, Chava, Deyanira, Edith, Hexón, Javier, Kike, León, Poncho, Randy** y **Susana** por su apoyo, trato, amistad y buenos ratos de sana convivencia.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por la beca otorgada, que permitió mi manutención durante la realización de este trabajo.

DEDICATORIAS

A las mujeres de mi vida

Mi esposa:

Vicky por su paciencia, comprensión, apoyo y amor incondicional que día con día me brinda.

Y a mi pequeña y preciosa hija:

América que sin poder aún, decir siquiera una palabra es mi orgullo y mi inspiración para seguir esforzándome y superarme cada día más.

A mis dos amores que al compartir su vida conmigo, llenan la mía de felicidad.

ÍNDICE

RESUMEN.	1
1. INTRODUCCIÓN.	2
2. ANTECEDENTES.	6
2.1. Las plantas como modelo de estudio.	6
2.1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> .	7
2.1.2. Estructura y función de la raíz de <i>Arabidopsis</i> .	7
2.1.3. Pelos radiculares.	9
2.1.4. Raíces laterales.	9
2.1.5. Raíces adventicias.	10
2.2. Reguladores del crecimiento.	11
2.3. Auxinas.	12
2.3.1. Biosíntesis de auxinas.	14
2.3.2. Transporte de auxinas.	15
2.3.3. Percepción de auxinas.	17
2.3.4. Genes de respuesta temprana de la familia <i>SAUR</i> .	18
2.3.5. Genes <i>GH3</i> .	19
2.3.6. Genes <i>AUX/IAA</i> .	19
2.3.7. Genes <i>ARF</i> .	20
2.3.8. Ruta de la degradación de proteínas por el proteosoma.	22
2.3.9. Ruta de transducción de señales de las auxinas.	23
2.3.10. Promotores inducibles por auxinas.	26
2.4. Antiauxinas.	27
2.5. La serotonina.	28
2.5.1. Señalización de la serotonina en animales.	28
2.5.2. La serotonina en las plantas.	29
2.5.3. Biosíntesis de serotonina en las plantas y en los animales.	30
3. JUSTIFICACIÓN.	31
4. OBJETIVOS.	32
4.1. Objetivo general.	32
4.2. Objetivos particulares.	32

5. MATERIALES Y MÉTODOS.	33
5.1. Material biológico.	33
5.2. Desinfección de las semillas.	33
5.3. Condiciones de crecimiento.	33
5.4. Crecimiento en suelo.	34
5.5. Variables de crecimiento.	35
5.6. Determinación de las etapas del desarrollo de los primordios de raíces laterales.	35
5.7. Análisis histoquímico de actividad de GUS y clareo de tejidos.	36
5.8. Análisis de estabilidad de la proteína AXR3/IAA17.	36
5.9. Cuantificación de serotonina por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).	37
5.10. Microscopía.	38
5.11. Detección de la proteína amarillo fluorescente (YFP) y tinción con yoduro de propidio (IP).	38
5.12. Análisis de datos.	38
6. RESULTADOS.	39
6.1. Efecto de la serotonina sobre la arquitectura de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	39
6.2. Efecto de la serotonina sobre el crecimiento y la división celular en raíces de <i>Arabidopsis</i> .	42
6.3. Efecto de la serotonina sobre la formación de primordios de raíces laterales.	43
6.4. Efecto de la serotonina sobre la organogénesis de raíces adventicias a partir de explantes de tallo.	45
6.5. Efecto de la serotonina sobre en el desarrollo de los pelos radiculares y la expresión del gen de la expansina 7.	46
6.6. Identificación y cuantificación de serotonina por GC-MS en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	48
6.7. Efecto de la serotonina sobre la expresión de genes inducibles por auxinas.	50
6.8. Efecto de la serotonina sobre la degradación de AXR3/IAA17 mediada por auxinas.	54

6.9. Efecto de la serotonina sobre la formación de raíces laterales inducidas por auxinas.	56
6.10. Efecto de la serotonina sobre la arquitectura de la raíz en mutantes de <i>Arabidopsis</i> afectadas en la respuesta a auxinas.	59
6.11. Efecto de la serotonina sobre la viabilidad celular.	61
7. DISCUSIÓN.	62
8. CONCLUSIONES.	68
9. REFERENCIAS.	69
10. APÉNDICE.	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Similitud estructural de los derivados del triptófano, ácido indol-3-acético y serotonina.	6
Figura 2. Organización celular de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	8
Figura 3. Etapas de desarrollo de las raíces laterales.	10
Figura 4. Reguladores del crecimiento y desarrollo de las plantas.	12
Figura 5. Representación esquemática de la compleja red de procesos e interacciones en la regulación de las respuestas a auxinas.	13
Figura 6. Rutas de biosíntesis del ácido indol-3-acético (AIA).	15
Figura 7. Modelo esquemático del transporte de auxinas célula-célula.	17
Figura 8. Modelo representativo del mecanismo de señalización de las auxinas.	26
Figura 9. Biosíntesis de la serotonina en las plantas y en los animales.	30
Figura 10. Efecto de bajas concentraciones de serotonina sobre la arquitectura del sistema radicular de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	40
Figura 11. Efecto de altas concentraciones de serotonina sobre la arquitectura del sistema radicular de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	41
Figura 12. Efecto de la serotonina en el desarrollo de raíces adventicias.	42
Figura 13. Efecto de la serotonina sobre la división y elongación celular.	43
Figura 14. Efecto de la serotonina sobre el desarrollo de primordios de raíces laterales.	44
Figura 15. Efecto de la serotonina sobre el desarrollo de raíces adventicias a partir de explantes de tallo de <i>Arabidopsis</i> .	45

Figura 16. Efecto de la serotonina sobre el desarrollo de los pelos radiculares.	47
Figura 17. Determinación y cuantificación de serotonina en plantas de <i>Arabidopsis</i> crecidas en presencia o ausencia de serotonina por GC-MS.	49
Figura 18. Efecto de la serotonina sobre la expresión de genes regulados por auxinas.	51
Figura 19. Efecto de la serotonina sobre la expresión de <i>DR5:uidA</i> en raíces adventicias a partir de explantes de hipocotilo.	52
Figura 20. Efecto antagónico de la serotonina sobre la expresión de genes regulados por AIA y ANA.	53
Figura 21. Análisis de la estabilidad de la proteína AXR3/IAA17 utilizando plantas transgénicas que expresan la construcción <i>HS::AXR3NT-GUS</i> .	55
Figura 22. Efecto de la serotonina en combinación con el ANA sobre el desarrollo de las raíces laterales.	57
Figura 23. Efecto antagónico de la serotonina sobre la formación de raíces laterales inducidas por ANA.	58
Figura 24. Efecto de la serotonina sobre la formación de raíces laterales en plantas silvestres y en mutantes relacionadas a auxinas.	59
Figura 25. Análisis comparativo del efecto de la serotonina y del AIA en mutantes afectadas en la respuesta a auxinas.	60
Figura 26. Efecto de la serotonina sobre la viabilidad celular del meristemo de la raíz.	61
Figura 27. Modelo propuesto de la acción de la serotonina sobre la regulación de la arquitectura de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	67

RESUMEN

La serotonina actúa como un neurotransmisor en los mamíferos regulando diferentes procesos hormonales y fisiológicos. En las plantas, este compuesto presenta una amplia distribución, habiéndose cuantificado en diferentes tejidos y condiciones de crecimiento. La serotonina se sintetiza a partir del aminoácido triptófano y muestra similitud estructural con el ácido indol-3-acético (AIA), que es la principal auxina descrita en el reino vegetal. Sin embargo, a diferencia del AIA, se conoce poco sobre el papel de la serotonina sobre los procesos de morfogénesis. En este trabajo se caracterizaron los efectos de la serotonina sobre el crecimiento y el desarrollo de plántulas de *Arabidopsis thaliana*. El análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) mostró que las plantas son capaces de captar la serotonina del medio de crecimiento, lo cual coincidió con una estimulación en el desarrollo de las raíces laterales cuando se aplicaron tratamientos de hasta 150 μ M. En contraste, concentraciones mayores de serotonina reprimieron el crecimiento de las raíces laterales, de la raíz primaria y el desarrollo de los pelos radiculares, pero estimularon la formación de raíces adventicias. Para investigar el papel de la serotonina en la modulación de las respuestas a auxinas, se realizaron experimentos utilizando líneas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan los marcadores inducibles por auxinas *DR5:uidA*, *BA3:uidA* y *HS::AXR3NT-GUS*, así como las mutantes afectadas en los loci *AUX1*, *AXR1*, *AXR2* y *AXR4*. Se encontró que la serotonina inhibe fuertemente la expresión de los marcadores *DR5:uidA* y *BA3:uidA* en la raíz primaria, en las raíces adventicias y en los primordios de las raíces laterales. Este compuesto mostró antagonismo en la expresión de genes regulados por auxinas bajo tratamientos con el AIA y el ácido naftalenacético (ANA), dos auxinas que regulan la arquitectura de la raíz. El análisis de las mutantes mostró también que la inducción de raíces laterales estimulada por la serotonina es independiente de los loci *AUX1*, *AXR2* y *AXR4*, pero requiere de *AXR1*. Nuestros resultados sugieren que la serotonina podría regular el desarrollo de la raíz actuando como un inhibidor de la respuesta a auxinas.

1. INTRODUCCIÓN.

Las plantas sintetizan una gran variedad de metabolitos para ajustar su crecimiento y desarrollo. Las auxinas, incluyendo el ácido-3-indol acético forman parte de un grupo de señales derivadas del triptófano (Woodward y Bartel, 2005). Un gran número de estudios realizados durante la última década han investigado los factores involucrados en la regulación de la morfogénesis de las plantas en respuesta a auxinas, las cuáles presentan una alta actividad biológica en concentraciones bajas tanto en sistemas *in vivo* como *in vitro*. Dichos fitoreguladores son esenciales para el mantenimiento de diferentes procesos fisiológicos y morfogenéticos incluyendo las respuestas a la luz y la gravedad, el desarrollo de pelos radicales, la formación de raíces laterales, adventicias y el desarrollo del sistema foliar (Woodward y Bartel, 2005). El crecimiento óptimo de las plantas requiere de un estricto control de la biosíntesis del AIA, de su transporte entre los tejidos, así como de los ciclos entre su forma activa e inactiva y la percepción a través de la familia de receptores de AIA (Leyser, 2006; Ljung *et al.*, 2002; Mockaitis y Estelle, 2008).

Aunque el AIA se encuentra entre los metabolitos del triptófano mejor caracterizados en las plantas, se han reportado compuestos relacionados estructuralmente, tal es el caso de la serotonina (5-hidroxitriptamina). La serotonina es una molécula ubicua y en los animales, al igual que en las plantas, se sintetiza a partir del triptófano y se le considera una hormona importante en la transmisión del impulso eléctrico, en actividades mitogénicas, además de actuar en procesos anti-inflamatorios y en la activación del sistema inmune (Frazer y Hensler, 1999). La serotonina se ha cuantificado en al menos 42 especies de plantas en diferentes tejidos incluyendo las raíces, las hojas, las semillas y los frutos (Grose, 1982; Engstrom *et al.*, 1992, Roshchina, 2001). En plantas, la serotonina se ha implicado en diferentes procesos fisiológicos tales como la floración, la senescencia, el desarrollo del follaje y en las respuestas de defensa (Odjakova y Hadjiivanova, 1997; Murch *et al.*, 2001; Roshchina, 2001; Kang *et al.*, 2009a; Ishihara *et al.*, 2008).

La biosíntesis de la serotonina en las plantas ocurre a través de dos pasos enzimáticos en los que participan las enzimas triptófano descarboxilasa (TDC), que cataliza la conversión del triptófano en triptamina, y la triptamina 5-hidroxilasa (T5H) que hidroxila el C-5 de la triptamina para formar la serotonina (Kang *et al.*, 2007a, b; Kang *et al.*, 2008; Kang *et al.*,

2009b). En las hojas de plantas de arroz (*Oryza sativa*) la expresión de la enzima TDC se encuentra en niveles relativamente bajos, que coinciden con una producción limitada de serotonina de alrededor de 0.3 µg/g de peso fresco. Sin embargo, la expresión de la TDC y la síntesis de serotonina aumentan en respuesta a señales que inducen la senescencia foliar como son la escasez de nutrientes o el desprendimiento de las hojas (Kang *et al.*, 2009a). Estos incrementos en los niveles de serotonina están relacionada estrechamente con la inducción transcripcional y enzimática de los genes para la biosíntesis de triptófano (Kang *et al.*, 2009a). De hecho, se han generado plantas transgénicas que sobreexpresan la TDC, las cuáles producen 25 veces más serotonina que las plantas silvestres y muestran senescencia retardada. Por el contrario, las plantas en las que se disminuyó la expresión de TDC mediante RNA de interferencia (RNAi) producen menos serotonina y envejecen más rápido que las plantas silvestres (Kang *et al.*, 2009a). Por otra parte, también se a encontrado que la serotonina se acumula en las hojas de plantas de arroz que son infectadas con el hongo patógeno *Bipolaris oryzae* (Ishihara *et al.*, 2008). En este caso, la acumulación de serotonina también está precedida por un aumento en el contenido de triptamina y por la expresión del gen TDC. El tratamiento con serotonina suprime el crecimiento de las hifas del hongo, lo cual indica que la activación de la ruta del triptófano está involucrada en el establecimiento de respuestas de defensa efectivas ante el ataque de patógenos a través de la producción de serotonina en plantas de arroz. En conjunto, la información antes mencionada indica que la concentración de serotonina en los tejidos de las plantas puede aumentar bajo condiciones de crecimiento particulares o cuando son atacadas por organismos patógenos. Aunque la serotonina se encuentra presente de manera natural en diversas especies vegetales, en la actualidad la información existente sobre los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de las plantas en respuesta a este compuesto es limitada.

El sistema radicular de *Arabidopsis thaliana* es un excelente modelo para caracterizar los efectos de compuestos con actividad biológica sobre el desarrollo (López-Bucio *et al.*, 2006; Contreras-Cornejo *et al.*, 2009). La raíz es un órgano esencial para las plantas ya que es el encargado de la toma de agua y nutrientes del suelo además de proporcionar soporte estructural. La raíz primaria se origina durante el desarrollo embrionario, la cual continúa su desarrollo durante todo el ciclo de vida produciendo pelos radicales y raíces laterales

con diferente grado de ramificación. La cantidad y localización de estas estructuras determinan la arquitectura del sistema radicular, la cual a su vez juega una función principal en la sobrevivencia de las plantas en diversas condiciones ambientales (Malamy y Benfey, 1997b; Casimiro *et al.*, 2003; López-Bucio *et al.*, 2005).

Durante el desarrollo post-embrionario de las plantas, pueden ocurrir eventos de organogénesis a partir del tallo o del follaje que conducen a la formación de raíces adventicias. Este tipo de raíces son importantes en cereales como el maíz, en donde proporcionan flexibilidad a la planta para responder eficientemente ante cambios ambientales, factores bióticos o el daño mecánico. La formación de raíces laterales y adventicias es un proceso complejo afectado por múltiples factores incluyendo los reguladores del crecimiento como las auxinas y los factores ambientales como la luz y la disponibilidad de nutrientes (Casimiro *et al.*, 2003; López-Bucio *et al.*, 2003; Péret *et al.*, 2009).

El control post-embrionario de la arquitectura de la raíz está regulado por el AIA, la principal auxina natural de las plantas. Este compuesto se mueve a través del floema desde su síntesis en los primordios de las hojas y las yemas axilares del tallo hacia la raíz, o por un mecanismo célula-célula alternativo, que está controlado finamente y que se conoce como transporte polar de auxinas (TPA). En este último proceso participan proteínas localizadas en la membrana plasmática que modulan la entrada del AIA a las células de los tejidos transportadores entre las que se incluyen los transportadores de influjo AUX1, así como proteínas de salida de la familia *PIN-FORMED* (PIN) y algunas glicoproteínas de la familia *MDR/PGP/ABCB* (Swarup *et al.*, 2004; Mravec *et al.*, 2008). Las plantas de *Arabidopsis* que presentan alguna mutación en los genes que codifican para la producción de las proteínas encargadas del transporte de auxinas o de la localización correcta de estas proteínas dentro de las células muestran resistencia al tratamiento con auxinas. Las mutantes *aux1-7* y *axr4-1*, que están alteradas en el gen *AUX1* que codifica un transportador de entrada de AIA, y en el gen *AXR4* que codifica para una proteína integral de vesículas, responsable de la localización de las proteínas AUX1, manifiestan una acumulación anormal de esta última en el retículo endoplásmico (RE) de las células epidérmicas indicando que el fenotipo agravitrópico de las mutantes es causado por

alteración en el movimiento de las proteínas AUX1 desde el RE hasta la membrana plasmática (Dharmasiri *et al.*, 2006).

Respecto a la percepción de la auxina, esta hormona interactúa con las proteínas TIR1 y AFB1-3 pertenecientes a la familia de proteínas F-box en *Arabidopsis* que a su vez forma parte del complejo SCF^{TIR1/AFB's}. Este último es el encargado de catalizar la ubiquitinación y posterior degradación de las proteínas represoras AUX/IAA mediada por el proteosoma 26S (Gray *et al.*, 2001; Dharmasiri *et al.*, 2005a,b; Kepinski *et al.*, 2005). En condiciones de baja concentración de auxinas, dichas proteínas represoras forman dímeros con los factores transcripcionales de respuesta auxinas (ARF) bloqueando su actividad. Por otra parte, existen otras mutantes de *Arabidopsis* resistentes a auxinas (*axr1*) aisladas mediante un escrutinio de plantas donde la raíz primaria crece en forma sostenida en concentraciones de AIA que normalmente inhiben el crecimiento (Lincoln *et al.*, 1990). Análisis posteriores demostraron que *AXR1* codifica para una proteína responsable de la activación enzimática de la proteína relacionada a ubiquitina (RUB1) en la conjugación de esta proteína con la ubiquitina ligasa (del Pozo *et al.*, 2002). Una vez liberados los ARF's, estos se unen a los promotores y activan la transcripción de los genes de respuesta a auxinas, como son la familias *GH3*, *SAURs* y *AUX/IAAs* (Lau *et al.*, 2008; Kieffer *et al.*, 2010). Respecto a esta última familia, se ha reportado que las mutaciones con ganancia de función en los genes *IAA3/SHY2*, *IAA7/AXR2*, *IAA12/BDL*, *IAA14/SLR*, *IAA18/CRANE*, *IAA19/MSG2* y *IAA28*, conducen a alteraciones en el desarrollo del sistema radicular (Tian y Reed, 1999; Nagpal *et al.*, 2000; Rogg *et al.*, 2001; Fukaki *et al.*, 2002; Tatematsu *et al.*, 2004; Uehara *et al.*, 2008). Particularmente, las mutantes con ganancia de función *slr1* e *iaa28* muestran una formación limitada de raíces laterales (Rogg *et al.*, 2001; Fukaki *et al.*, 2002). Estas observaciones indicaron que las proteínas *AUX/IAA* funcionan como reguladores negativos en el desarrollo de las raíces laterales, aunque hasta la fecha no se ha realizado un análisis detallado del sistema radicular en estas mutantes.

Con base en la similitud estructural del AIA con la serotonina y considerando que ambos son derivados del triptófano (Fig. 1), en este trabajo se planteó la posibilidad de que la serotonina podría actuar a través de la ruta de señalización de las auxinas para modular las respuestas del desarrollo, ya sea activando o reprimiendo las respuestas a auxinas. Por esta razón, se caracterizaron los efectos de la serotonina sobre la arquitectura de la raíz y las

respuestas reguladas por auxinas en *Arabidopsis thaliana*. Nuestros resultados mostraron que la serotonina presenta un efecto dual en la formación de raíces laterales, por un lado estimulando la formación de primordios en concentraciones bajas (10 a 160 μ M) y por otro lado reprimiendo la maduración de raíces laterales en concentraciones mayores. También en concentraciones altas, la serotonina mostró un efecto promotor en la formación de raíces adventicias, pero reprimió el crecimiento de la raíz primaria y el desarrollo de pelos radiculares. El análisis detallado del efecto de la serotonina en el desarrollo de la raíz de mutantes de *Arabidopsis* afectadas en la respuesta a auxinas (*aux1-7*, *axr1-3*, *axr2-1* y *axr4-1*) y su efecto sobre la expresión de genes de respuesta a auxinas sugirieron que la serotonina podría ser un inhibidor natural de auxinas en las plantas.

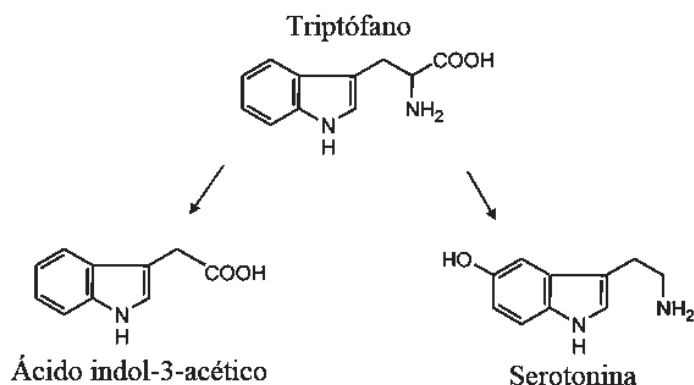


Figura 1. Similitud estructural de los derivados del triptófano, ácido indol-3-acético y serotonina (Modificado de Murch *et al.*, 2001).

2. ANTECEDENTES.

2.1. Las plantas como modelo de estudio.

Las plantas al igual que los animales, son organismos multicelulares complejos en los cuales hay división de funciones entre las células que forman los diferentes tejidos y órganos. Las actividades celulares están coordinadas de manera precisa para contribuir a la supervivencia del organismo. En general, las plantas se dividen en dos sistemas, el sistema aéreo y el radicular. La parte aérea incluye órganos tales como las hojas, los brotes, las

flores y los frutos, en donde se lleva a cabo la fotosíntesis y la reproducción. Mientras que la raíz es el órgano responsable del anclaje de la planta al suelo y posee estructuras tales como los pelos radiculares y las raíces laterales que son responsables de la captación de agua y nutrientes (Himanen *et al.*, 2002). Al ser organismos sésiles, las plantas tienen que responder eficientemente a los diferentes estímulos ambientales para sobrevivir y adaptarse. Esta característica las convierte en excelentes modelos de investigación para el estudio de procesos celulares, fisiológicos, morfogenéticos y adaptativos.

2.1.1. *Arabidopsis thaliana*.

Arabidopsis thaliana es una planta perteneciente a la familia de las Brassicaceas que a diferencia de otras plantas utilizadas en investigación, reúne numerosas ventajas que incluyen un tamaño pequeño (alrededor de 30 cm), un ciclo de vida corto (6-8 semanas), una alta fecundidad (una planta puede producir hasta 10,000 semillas) y la posibilidad de crecerla *in vitro*, además de tener su genoma totalmente secuenciado (Bennetzen, 2001). En particular, su raíz tiene características que la hacen un modelo ideal para estudiar procesos de crecimiento y desarrollo. La simplicidad de su organización celular la hace manejable para la manipulación experimental cubriendo varios aspectos morfogenéticos (Scheres y Wolkenfelt, 1998). Adicionalmente, el uso extensivo de *Arabidopsis* durante las dos últimas décadas ha permitido la creación de bancos de semillas mutagenizadas, de colecciones de mutantes y líneas transgénicas. Además con la secuencia completa del genoma disponible, ahora, es posible adquirir por catálogo mutantes insercionales afectadas en genes específicos para analizar la participación de diferentes rutas de señalización en los programas de crecimiento y desarrollo (Dinneny y Benfey, 2009).

2.1.2. Estructura y función de la raíz de *Arabidopsis*.

La raíz como se mencionó anteriormente, es el órgano de la planta cuyas funciones son el anclaje al suelo, la absorción de agua y nutrientes, así como la interacción con el medio ambiente biótico y abiótico. Aunque la estructura de la raíz y de la planta en general se encuentra bajo un control genético característico de cada especie, el genoma es plástico e

integra las instrucciones para responder a cada uno de los factores del ambiente. La raíz está formada por diferentes capas celulares definidas que se originan a partir de un grupo pequeño de células en el meristemo de la raíz conocidas como células iniciales o fundadoras (Schiefelbein *et al.*, 1997). Dichas capas celulares son: la epidermis, el córtex, la endodermis y el periciclo, capa celular que rodea el sistema vascular de la raíz comprendido por el xilema y el floema (Fig. 2) (Dolan *et al.*, 1993; Casimiro *et al.*, 2001; Overvoorde *et al.*, 2010).

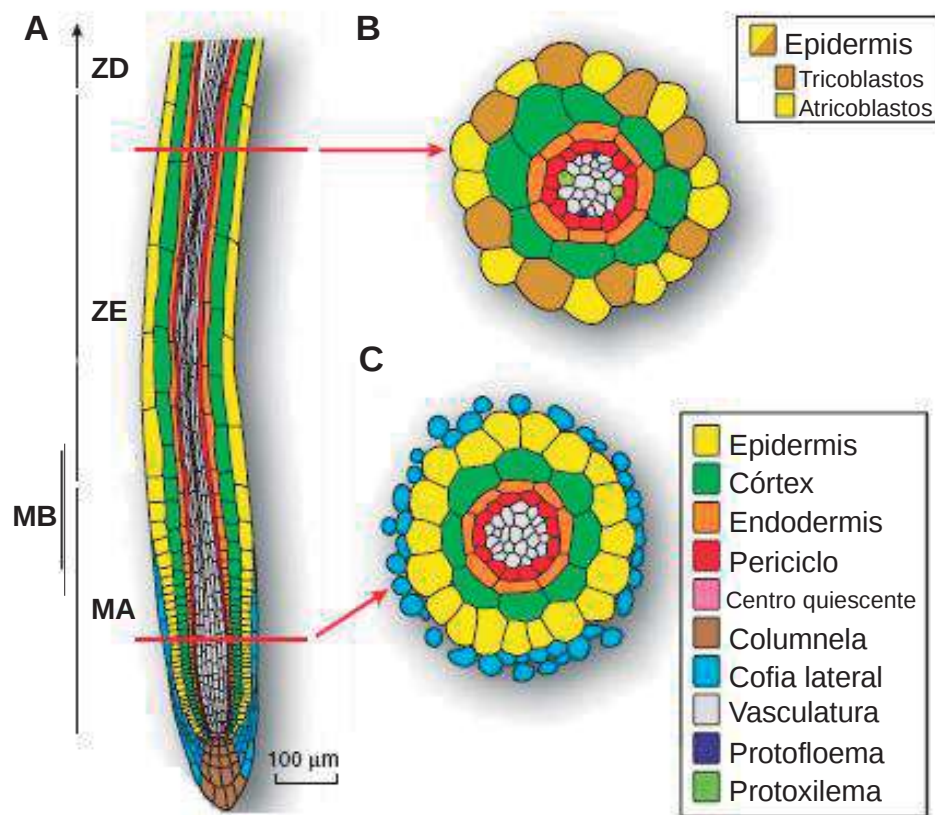


Figura 2. Organización celular de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Organización proximal-distal de la raíz de *Arabidopsis*, meristemo apical (MA), meristemo basal (MB), zona de elongación (ZE) y zona de diferenciación (ZD) (A). Organización radial de la zona indicando las capas celulares en la zona de elongación (B) y el meristemo (C) (Modificado de Overvoorde *et al.*, 2010).

2.1.3. Pelos radiculares.

Los pelos radiculares son estructuras epidérmicas de la raíz que tienen una función primordial en la captación de agua y nutrientes, dichos órganos contribuyen de manera importante en los procesos antes mencionados, aumentando la superficie de absorción de la raíz. Sin embargo, estas estructuras no son esenciales para la supervivencia de la planta como se ha evidenciado por el uso de mutantes de *Arabidopsis* afectadas en la formación de pelos. En *Arabidopsis* los pelos radiculares se forman invariablemente sobre las células epidérmicas que se encuentran posicionadas encima de la pared celular entre dos células corticales (Dolan y Costa, 2001). En la epidermis se presentan dos diferentes tipos de células; aquellas que forman pelos radiculares conocidas como tricoblastos y las que no los forman llamadas atricoblastos (Dolan *et al.*, 1994; Foreman y Dolan, 2001). La identidad de dichas células está regulada por la información posicional de estas respecto de las células corticales. Una vez establecida la identidad de las células epidérmicas aquellas que formarán pelos radiculares inician este proceso formando una protuberancia que formará el pelo radicular. Para el crecimiento de la protuberancia se requiere la expansión de la pared celular del tricoblasto, el rearrreglo del citoesqueleto y la actividad de enzimas que modifican la pared celular tales como celulasas y expansinas. Análisis genéticos sobre el desarrollo de los pelos radiculares han permitido identificar los genes requeridos para la iniciación y el crecimiento de dichas estructuras (Lee y Schiefelbein, 2002). En *Arabidopsis*, el etileno y las auxinas afectan la formación de los pelos radiculares. Mutantes como *axr2* y *aux1* de la ruta de las auxinas y *etr1* de la cascada de señalización del etileno, muestran alteraciones en el desarrollo de los pelos radiculares (Pitts *et al.*, 1998; Grierson y Schiefelbein, 2002).

2.1.4. Las raíces laterales.

Las raíces laterales son importantes en la captación de agua y nutrientes ya que un sistema radicular más ramificado abarca mayor superficie exploratoria en el suelo (López-Bucio *et al.*, 2005). Las raíces laterales de *Arabidopsis* como en muchas dicotiledóneas, se forman a partir de las células del periciclo, opuestas a los polos del xilema en la capa de células más

cercana al cilindro vascular de la raíz (Dolan *et al.*, 1993; Dubrovsky y Rost, 2005). La formación de las raíces laterales comienza con una serie de divisiones periclinales y anticlinales a partir las células del periciclo pasando por diferentes etapas de desarrollo (I-VII) hasta la emergencia de una raíz lateral madura (Fig. 3) (Malamy y Benfey, 1997a; Casimiro *et al.*, 2001, 2003). En general, la formación de las raíces laterales se puede dividir en 4 etapas principales: 1) la estimulación y desdiferenciación de células del periciclo, 2) La división celular en las capas que forman el primordio, 3) la emergencia del primordio de la raíz primaria mediante eventos de expansión celular y 4) la activación del meristemo de la raíz lateral para continuar su crecimiento (Malamy y Benfey, 1997a).

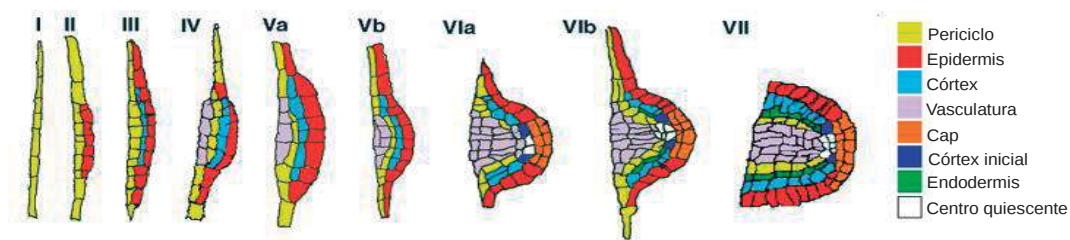


Figura 3. Etapas de desarrollo de las raíces laterales. Representación de las etapas del desarrollo de los primordios (I-VII), para la formación de raíces laterales (Modificado de Malamy y Benfey, 1997a).

2.1.5. Las raíces adventicias.

Las raíces adventicias son esenciales para la supervivencia de un gran número de especies de plantas. En *Arabidopsis* a diferencia de las raíces laterales que surgen a partir de la raíz primaria, las raíces adventicias no se forman de los tejidos de la raíz sino de la parte aérea de la planta, principalmente a partir del hipocotilo en el follaje y son inducidas en respuesta a la aplicación de auxinas (Falasca y Altamura, 2003). En condiciones normales de crecimiento, la formación de este tipo de raíces en *Arabidopsis* es esporádica. Sin embargo, se han descrito mutantes que presentan una mayor formación de raíces adventicias, lo que sugiere que este proceso está regulado a nivel genético. Las raíces adventicias cumplen con funciones similares a las descritas para las raíces laterales y la raíz primaria e incluso, a pesar de producirse en la parte aérea, presentan una organización y estructura similar a la de la raíz primaria y raíces laterales (Falasca y Altamura, 2003).

2.2. Reguladores del crecimiento.

Los reguladores del crecimiento o fitohormonas (auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno entre otros) son compuestos de diferente naturaleza química producidos por la planta a través de varias rutas metabólicas, que pueden alterar el crecimiento y desarrollo vegetal en pequeñas concentraciones. El crecimiento y desarrollo de las plantas requiere de la integración de señales ambientales y endógenas las cuales junto con el programa genético intrínseco determinan la forma de la planta. Las plantas al ser organismos sésiles deben contar con un sistema sofisticado para integrar información y responder activamente a los estímulos bióticos y abióticos, así como poseer mecanismos de comunicación entre los diferentes órganos y tejidos. En la actualidad, se acepta que los reguladores del crecimiento forman un grupo de moléculas encargadas de la integración de esta información, cuyas vías de señalización interactúan con frecuencia para regular la morfogénesis vegetal. Los reguladores del crecimiento mas estudiados son las auxinas, las citocininas, las giberelinas, el ácido abscísico y el etileno (Gray, 2004), aunque el número de compuestos con función señalizadora ha venido incrementándose, dentro de estos nuevos compuestos se pueden incluir el ácido jasmónico, los brasinoesteroides, el ácido salicílico, las *N*-acil etanolaminas, el glutamato y el óxido nítrico, entre otros (López-Bucio *et al.*, 2006; Morquecho-Contreras y López-Bucio, 2007; Santner *et al.*, 2009). Dichas sustancias pueden transportarse entre los diferentes tejidos a través del sistema vascular, como en el caso de las auxinas, o difundirse libremente a través de las membranas como el etileno (Gray, 2004). Prácticamente todos los aspectos del desarrollo vegetal en cierta medida están bajo el control de los reguladores del crecimiento. Un solo regulador puede afectar una gran variedad de aspectos celulares y procesos del desarrollo, en tanto que al mismo tiempo varios reguladores pueden influir en un mismo proceso (Gray, 2004).

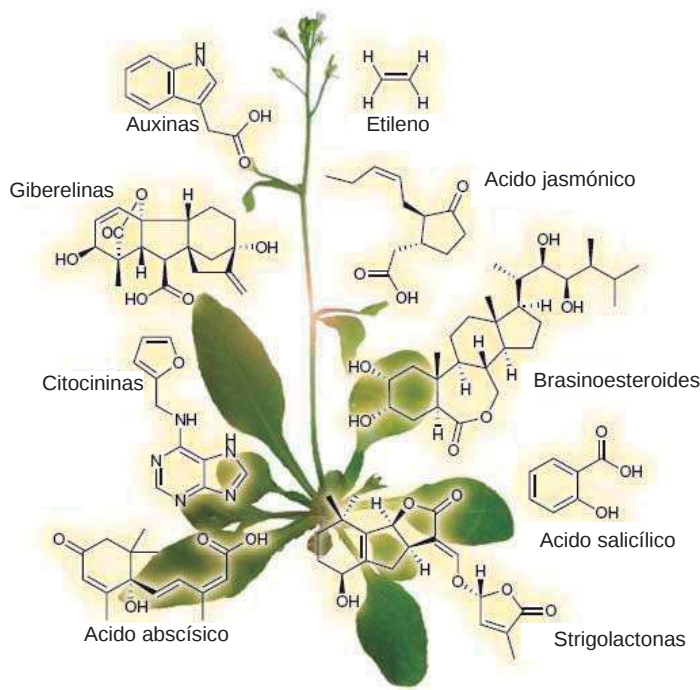


Figura 4. Reguladores del crecimiento y desarrollo de las plantas. Auxinas: regulan la división y expansión celular, procesos de diferenciación, el desarrollo de raíces laterales y la dominancia apical. Citocininas: promueven la división celular y están involucradas en germinación, senescencia y funcionamiento de los meristemos de la raíz y del follaje. Etileno: induce la maduración de fruto, la senescencia y respuestas de estrés biótico y abiótico. Giberelinas: inducen la germinación, elongación del tallo y la floración. Ácido abscísico: promueve la latencia de las semillas y participa en diferentes rutas de señalización por estrés. Ácido jasmónico: modula el desarrollo del polen y las respuestas de estrés y defensa. Brasiñoesteroides: regulan la expansión celular y la fotomorfogénesis. Ácido salicílico: regula respuestas de defensa (Gray, 2004; Santner *et al.*, 2009).

2.3. Auxinas.

Las auxinas, cuyo nombre deriva de la palabra griega “*auxein*” que significa crecer, forman uno de los principales grupos de reguladores del crecimiento. En los tejidos de las plantas existe un gran número de metabolitos derivados del triptófano entre los que se encuentran las auxinas, fitoalexinas, alcaloides y compuestos indólicos (Radwanski y Last, 1995). Sin embargo, el metabolito más estudiado en las plantas y su principal auxina es el ácido indol-3-acético (Woodward y Bartel, 2005). Esta auxina es de gran importancia para el desarrollo vegetal ya que participa en la regulación de un gran número de procesos durante todo el

ciclo de vida. Algunos de estos procesos son la regulación de respuestas trópicas tanto a la luz como a la gravedad, la regulación de la arquitectura de la raíz y el follaje, la formación de órganos y el desarrollo vascular, también se encuentran involucradas en el control de la abscisión, incrementan la tasa de división en el cambium, ayudan al desarrollo del ovario y son responsables de la dominancia apical (Woodward y Bartel, 2005). En general los efectos de las auxinas dependen de la concentración, ya que en concentraciones bajas promueven el crecimiento induciendo la elongación de los hipocotilos, del follaje y de las raíces, en tanto que a concentraciones más elevadas los efectos son opuestos ya que inhiben la elongación de la raíz y del tallo (Woodward y Bartel, 2005; Benjamis y Scheres, 2008). Además del AIA, existen un gran número de auxinas naturales como el AIA y el ácido indol butírico, o sintéticas entre las que se encuentran el ácido 1-naftalen acético (ANA), el indol-3-etanol (IET), el indol-3-acetaldehído (IAAID), y el ácido fenol acético (PAA) (Kende y Zeevaart, 1997). En *Arabidopsis thaliana* las respuestas inducidas por auxinas comprenden una red de procesos regulada y compleja, que incluye la síntesis de auxinas, la disponibilidad en su forma activa, la regulación de su transporte a través de la planta, su percepción y señalización, además de las interacciones con otras señales tanto endógenas como del ambiente (Kieffer *et al.*, 2010) (Fig. 5).

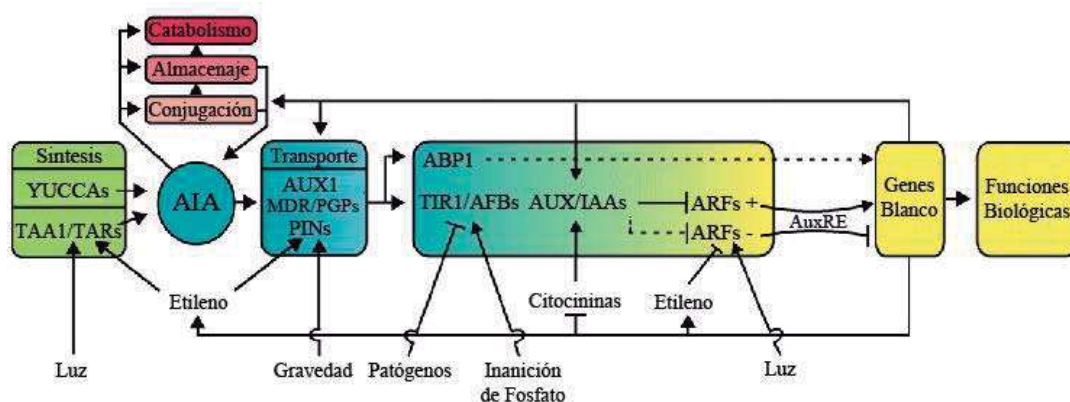


Figura 5. Representación esquemática de la compleja red de procesos e interacciones en la regulación de las respuestas a auxinas. Aquí se incluye la síntesis de AIA (en verde los genes de la síntesis), la regulación de su disponibilidad en la forma activa (en rojo procesos de regulación), el transporte de la auxina (cuadro azul, transportadores), la percepción y señalización (rectángulo central receptores, y factores transcripcionales activadores y represores), además las diversas señales endógenas y ambientales que interactúan en la ruta ejemplificando la complejidad de las interacciones en la regulación de las respuestas a auxinas (Modificado de Kieffer *et al.*, 2010).

2.3.1. Biosíntesis de auxinas.

En *Arabidopsis thaliana* las concentraciones más altas de AIA se localizan en las regiones meristemáticas y en aquellas con crecimiento activo como las hojas jóvenes, los cotiledones y en los primordios de las raíces, siendo dichos tejidos los de mayor capacidad biosintética de este compuesto (Ljung *et al.*, 2001). A lo largo de los años se han propuesto diferentes rutas para la síntesis del AIA, sin embargo, aún no se ha logrado caracterizar en su totalidad alguna de ellas y se sugiere que diferentes rutas participan de manera redundante en la producción del AIA (Woodward y Bartel, 2005). Hasta la fecha, se ha logrado un avance importante en la identificación de los genes involucrados en la síntesis de AIA a partir del triptófano, así como de rutas independientes del triptófano (Fig. 6) (Woodward y Bartel, 2005; Delker *et al.*, 2008).

Como parte de la síntesis de AIA a partir del Trp se han sugerido cuatro rutas las cuales se distinguen por intermediarios como el ácido indol-3-pirúvico (IPA), la indol-3-acetamida (IAM), la triptamina (TAM) y la indol-3-acetaldoxima (IAOx). Se ha demostrado la participación de los citocromos P450 (CYP79B2 y CYP79B3) en la biosíntesis de auxinas que convierten el Trp en IAOx (Woodward y Bartel, 2005). Hallazgos recientes indican que la conversión de TAM hacia N-hidroxi-TAM, un intermediario de la triptamina a indol-3-acetaldoxima se realiza por la acción de una familia de flavin monooxigenasas tipificado por la mutante *yucca* y el paso de Trp hacia IPA ocurre mediante la triptófano aminotransferasa de *Arabidopsis* (TAA1) (Woodward y Bartel, 2005; Delker *et al.*, 2008).

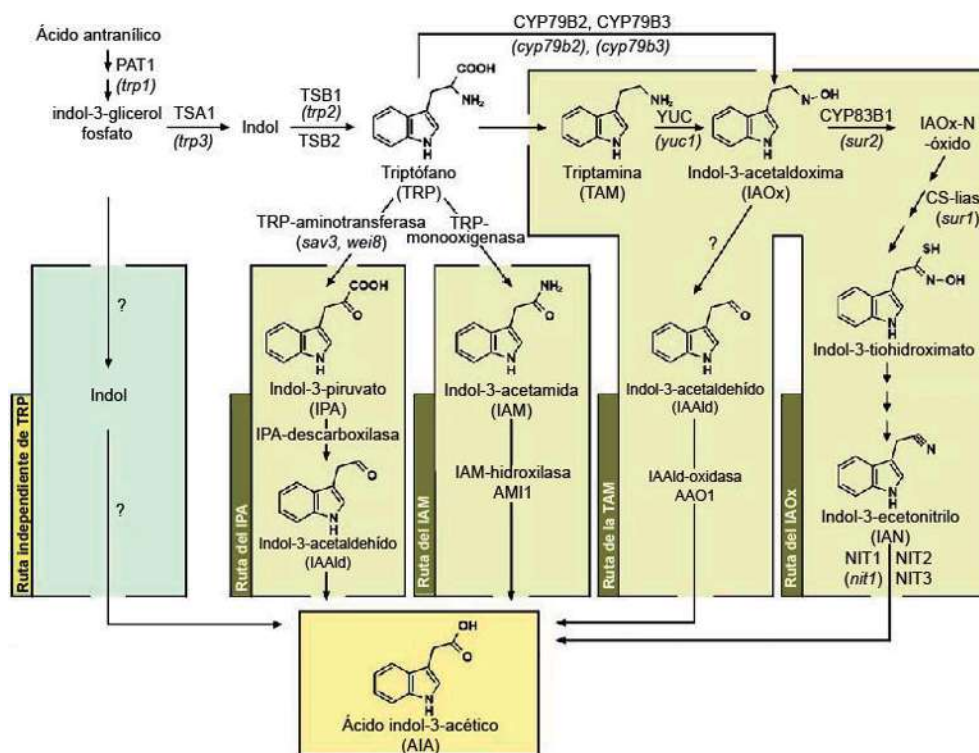


Figura 6. Rutas de la biosíntesis del ácido indol-3-acético (AIA). El AIA se puede sintetizar a través de rutas dependientes e independientes del triptófano, las enzimas cuyos genes están identificados en *Arabidopsis* se presentan en mayúsculas sin paréntesis y en minúsculas entre paréntesis las mutantes de *Arabidopsis* afectadas en diferentes pasos. El signo de interrogación indica que no se ha identificado los genes involucrado en dichas conversiones (modificado de Delker *et al.*, 2008).

2.3.2. Transporte de auxinas.

Las auxinas son moléculas que pueden ser sintetizadas en diferentes partes de la planta. Sin embargo, el flujo hacia los diferentes sitios de acción requiere de un mecanismo de transporte sofisticado para un desarrollo adecuado. En las hojas, el AIA se transporta de manera unidireccional desde las células apicales hacia la base, mientras que en la raíz se transporta de manera bidireccional, del brote al ápice radicular (transporte acropétalo) también conocido como transporte polar y del ápice radicular a la base (transporte basipétalo). En el transporte polar de auxinas participan proteínas transportadoras de inlfujo como AUX1 y de salida de la familia PIN, MDR y PGP que en conjunto regulan la distribución controlada del AIA para generar gradientes de concentración en tejidos específicos. Dichos gradientes son importantes debido a que el AIA lleva acabo su efecto a

través la formación de máximos de concentración de la auxina (Benková *et al.*, 2003). Respecto al transporte del AIA al ser un ácido débil puede encontrarse en forma protonada o no protonada dependiendo del pH. En las plantas el pH apoplástico es ~5.5 favoreciendo que las moléculas del AIA se encuentren en su forma disociada en un ~83% y en su forma protonada en un ~17% (Zazímolová *et al.*, 2010). Esta última forma se puede difundir libremente hacia el interior de la célula (difusión pasiva) o a través del transportador de entrada *AUX1*. Sin embargo, una vez dentro de la célula el cambio de pH del medio, favorece la forma disociada del AIA casi en su totalidad, por lo que las moléculas en dicha forma, requieren de un mecanismo de transporte activo a través de múltiples proteínas transportadoras de salida como las familias PIN y MDR/PGP's (Fig. 7) (Swarup *et al.*, 2004; Mravec *et al.*, 2008; Benjamins y Scheres, 2008; Zazímolová *et al.*, 2010).

Los genes PIN codifican proteínas con 10 dominios transmembranales que tienen similitud con otras proteínas que participan en el transporte a través de la membrana plasmática. En consecuencia, las proteínas PIN muestran una localización asimétrica en la membrana plasmática consistente con el papel de controlar la polaridad en el movimiento de auxinas (Benjamins y Scheres, 2008). Un segundo componente proteico del sistema de transporte de salida, es el sitio de unión de los inhibidores de transporte de auxinas tales como el ácido N-naftiltalámico (NPA) y el ácido triyodobenzoico (TIBA), el cual lleva a cabo una función regulatoria (Swarup *et al.*, 2004; Mravec *et al.*, 2008).

El movimiento acropétalo de AIA de la parte aérea hacia la raíz se ha implicado en el control del crecimiento de las raíces laterales, mientras que el movimiento basipétalo de AIA del extremo radicular es requerido para la respuesta gravitrópica, pero también se ha sugerido, que afecta la división celular durante la formación de las raíces laterales (Swarup *et al.*, 2004; Mravec *et al.*, 2008).

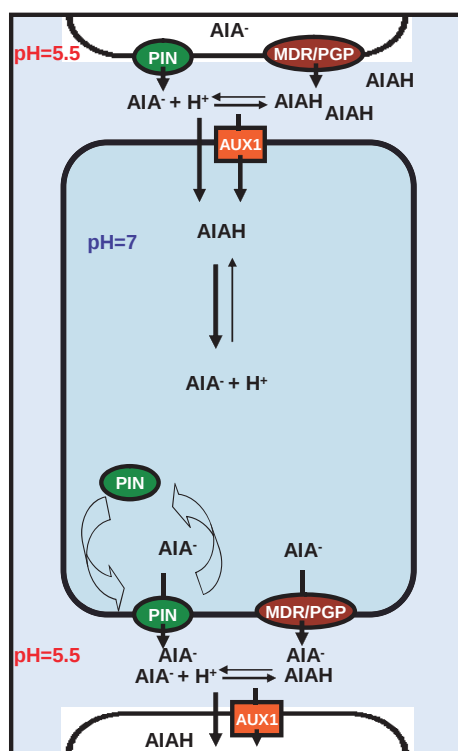


Figura 7. Modelo esquemático del transporte de auxinas célula-célula. El AIA en el espacio intercelular (pH=5.5) se encuentra preferentemente en su forma protonada, por lo cual puede entrar por difusión a la célula. Mayores cantidades de AIA requieren al transportador de entrada AUX1. En el citoplasma (pH=7.0), el AIA queda en forma ionizada y por lo tanto requiere de los transportadores de salida de las familias PIN, PGPs y MDRs (Modificado de Vieten *et al.*, 2007).

2.3.3. Percepción de auxinas.

Cada una de las respuestas auxínicas involucra la regulación de la expresión de cientos de genes, proceso que se lleva a cabo a través de una ruta de transducción de señales. La percepción de auxinas involucra tres componentes principales: 1) los receptores de auxinas de la familia TIR1/AFB's y ABP1, 2) los factores de respuesta a auxinas de la familia ARF y 3) los genes de respuesta temprana. Los receptores transducen la señal en respuestas específicas al regular la expresión de los genes de respuesta temprana, de los cuáles se ha identificado un número considerable y se agrupan en tres clases: genes *SAUR* (*SMALL AUXIN UP RNA*), *GH3* (*Gretchen Hagen3*) y *AUX/IAA* (*AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID*) (Abel y Theologis, 1996; Ulmasov *et al.*, 1997b; Guilfoyle, 2007).

2.3.4. Genes de respuesta temprana de la familia SAUR.

Los transcritos de los genes SAUR (RNAs pequeños) se acumulan rápidamente en hipocotilos de soya tratados con auxinas y cuya expresión se incrementa entre los 2 a 5 min en respuesta a tratamientos con auxinas (Walker y Key, 1982). Los genes SAUR se expresan en la zona de elongación celular en hipocotilos de soya y en las células epidérmicas y corticales de la raíz, y después de la inducción por auxinas se presentó una inducción de los transcritos en los mismos tejidos (Gee *et al.*, 1991).

Los genes SAUR han sido descritos también en otras especies de plantas tales como el frijol (Yamamoto *et al.*, 1992), el chícharo (Guilfoyle *et al.*, 1993), Arabidopsis (Gil *et al.*, 1994), el rábano (Anai *et al.*, 1998) y el maíz (Yang y Poovaiah, 2000). En Arabidopsis existen alrededor de 70 genes SAUR, los cuales pertenecen a diferentes grupos dependiendo de su homología de secuencia, aunque no se sabe cuántos y cuáles de dichos genes se expresan y son inducibles por auxinas. Los genes SAUR se regulan a nivel transcripcional por auxinas, sin embargo, existe evidencia de que algunos SAURs también podrían estar regulados post-transcripcionalmente (McClure *et al.*, 1989; McClure y Guilfoyle, 1987).

Los genes SAUR codifican mRNAs pequeños y de vida corta (McClure y Guilfoyle, 1989; Franco *et al.*, 1990), característica que se atribuye a un elemento conservado (DST) en la región 3' no traducida del mRNA y/o a elementos dentro del marco de lectura abierto (ORF) (Li *et al.*, 1994; Sullivan y Green, 1996). En mutantes de Arabidopsis que presentan transcritos estables no se ha encontrado algún fenotipo morfológico (Johnson *et al.*, 2000), y la función de las proteínas SAUR es aún desconocida. Sin embargo, se sugiere que pueden operar a través de una ruta de transducción de señales de auxinas que involucra calcio y calmodulina (CaM), debido a que datos experimentales indican que la calmodulina puede unirse a un dominio amino terminal presente en varias proteínas SAUR. Aunque la secuencia de amino ácidos en este dominio no está altamente conservada entre las proteínas SAUR, un dominio hélice α -anfipático probable puede proporcionar un sitio de unión a CaM en estas proteínas, lo cual sugiere que las proteínas SAUR's en general son proteínas de unión a calmodulina (Hagen y Guilfoyle, 2002).

2.3.5. Genes *GH3*.

Los genes *GH3* forman otra familia de genes que son rápidamente inducidos por auxinas en plantas de soya (Hagen *et al.*, 1984) aunque otras plantas presentan también dichos genes. En *Arabidopsis* esta familia de genes consta de 20 miembros referidos como *AtGH3-1* – *AtGH3-20*, que codifican para proteínas con masas moleculares de 65-70 kDa (Khan y Stone, 2007). La expresión ectópica de diferentes genes *GH3* presenta una gran variedad de fenotipos, sugiriendo que podrían tener funciones parcialmente redundantes pero también una participación específica de estas proteínas en las respuestas a auxinas y a otros reguladores y/o en respuesta a factores ambientales como la luz (Hagen y Guilfoyle, 2002). Además, se ha observado que al menos algunos de los miembros de esta familia de genes codifican para enzimas que conjugan el AIA, el ácido jasmónico o el ácido salicílico con distintos aminoácidos (Staswick *et al.*, 2009), lo que sugiere un posible mecanismo de regulación de la respuesta auxínica por la inactivación del AIA (Khan y Stone, 2007).

2.3.6. Genes *AUX/IAA*.

Inicialmente se clasificaron como genes de respuesta temprana a auxinas debido a su inducción rápida de 5-80 min. (Abel *et al.*, 1994). En *Arabidopsis* se han encontrado 29 genes *AUX/IAA*, que codifican proteínas nucleares de vida corta, de tamaño de 20 a 35 kDa y la mayoría presenta cuatro dominios conservados cuyas características se describen a continuación (Hagen y Guilfoyle, 2002; Liscum y Reed, 2002). Aunque el dominio III de dichas proteínas teóricamente es de unión al DNA, no se ha encontrado que interactúen directamente con el DNA sino que ejercen su función actuando como represores transcripcionales al interactuar con factores de respuesta a auxinas del tipo de los ARF (AUXIN RESPONSE FACTOR) (Ulmasov *et al.*, 1997a; Tiwari *et al.*, 2001, 2003). El dominio II juega un papel importante en la estabilidad de las proteínas *AUX/IAA* al interactuar con la proteína F-box (*TIR1*), la cual es un componente de un complejo ubiquitina ligasa conocido como SCF^{TIR1} (Gray *et al.*, 2001). Las auxinas incrementan la interacción con este complejo en una manera dosis-dependiente promoviendo la degradación rápida de las proteínas represoras *AUX/IAA* a través de la ruta ubiquitina-

proteosoma (Gray *et al.*, 2001; Zenser *et al.*, 2001). Los dominios III y IV presentan una secuencia similar de aminoácidos en los motivos III y IV encontrados en el C-terminal de las proteínas ARF's lo cual permite que estos motivos modulen la homo y heterodimerización entre los represores AUX/IAA y las proteínas ARF (Kim *et al.*, 1997; Ulmasov *et al.*, 1997a; Morgan *et al.*, 1999; Ouellet *et al.*, 2001). El papel que desempeña el dominio I en las proteínas AUX/IAA es menos claro, pero existe información que sugiere que este dominio podría participar en la homodimerización de proteínas AUX/IAA (Ouellet *et al.*, 2001).

Se han caracterizado un gran número de mutantes de pérdida de función en los genes *AUX/IAA*, pero estas no presentan fenotipos claros, lo que sugiere una redundancia genética dentro de esta gran familia de genes (Woodward y Bartel, 2005). La mayoría de los conocimientos obtenidos acerca de la función biológica de las proteínas AUX/IAA se han obtenido mediante la caracterización de mutantes con ganancia de función en varios genes *AUX/IAA*. Dichas mutantes presentan fenotipos característicos en diferentes aspectos del desarrollo (Woodward y Bartel, 2005). Cada una de las mutaciones caracterizadas presentaron una alteración en el dominio II, lo cual confirió estabilidad a la proteína disminuyendo así su degradación mediada por la vía ubiquitina-proteosoma (Dreher *et al.*, 2006).

2.3.7. Genes ARF.

Mediante el análisis detallado de los promotores de genes representativos de cada una de las clases primarias, se identificó un elemento de respuesta a auxinas común denominado por sus siglas en ingles *auxin-response element (AuxER)*, que frecuentemente esta compartido ente los genes de respuesta temprana a auxinas (Ballas *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1994). Subsecuentemente, con el fin de identificar factores de transcripción que se unieran a dichos elementos AuxRE, se llevaron a cabo experimentos utilizando como cebo uno de los elementos de respuesta a auxina en un sistema de un híbrido en levadura, identificando al factor de respuesta a auxinas, por siglas en ingles *Auxin Response Factor (ARF1)* (Ulmasov *et al.*, 1997a). En *Arabidopsis* se han encontrado 23 miembros pertenecientes a esta familia de genes o factores de respuesta a auxinas (Ulmasov *et al.*,

1999a). Todos ellos presentaron una estructura similar identificándose por su dominio de unión al ADN en el extremo N-terminal (único en plantas), el cual se une a los *AuxER* (Ulmasov *et al.*, 1997a,b; Guilfoyle *et al.*, 1998). Los análisis de expresión de los genes *ARF1-ARF10* han mostrado su presencia en la mayoría de los órganos de plantas de *Arabidopsis* (Ulmasov *et al.*, 1999b). El intervalo en tamaño de las proteínas ARF es de 70-130 kDa. La mayoría de los ARF's presentan un dominio carboxilo terminal con estructura similar a los dominios II y IV de las proteínas AUX/IAA. El dominio carboxilo terminal en ambas proteínas participa en las interacciones proteína-proteína que permiten la homodimerización de ARFs y heterodimerización de ARF y AUX/IAA (Ulmasov *et al.*, 1997a, 1999a,b; Kim *et al.*, 1997; Ouellet *et al.*, 2001). Los dominios II y IV en algunas proteínas ARF incrementan la unión *in vitro* de dichas proteínas con la secuencia TGTCTC de los elementos de respuesta a auxinas (AuxRE) presentes en los promotores inducidos por auxinas. Las regiones medias de las proteínas ARF funcionan como dominios de activación o represión de la transcripción dependiendo de su secuencia de aminoácidos. Ensayos de transfección con protoplastos indicaron que las proteínas ARF1 y ARF2, contienen regiones medias ricas en prolina y serina y actúan como represores; mientras que las ARF5, ARF6, ARF7 y ARF8 presentaron regiones medias ricas en glutamina y funcionaron como activadores de la transcripción (Ulmasov *et al.*, 1997a).

Estudios genéticos han demostrado el papel de varios *ARFs* en distintos procesos morfológicos incluyendo la embriogénesis (*ARF5* y *ARF17*) (Hardtke *et al.*, 2004; Mallory *et al.*, 2005), el desarrollo de la raíz (*ARF7*, *ARF19*, *ARF10* y *ARF16*) (Okushima *et al.*, 2005,2007; Mallory *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005), de la flor (*ARF2*, *ARF3/ETTIN*) (Ellis *et al.*, 2005; Nagpal *et al.*, 2005), y la senescencia (*ARF1* y *ARF2*) (Ellis *et al.*, 2005). Debido a la redundancia funcional de las proteínas ARF, la mutación de un solo gen *ARF* en plantas de *Arabidopsis* carecen de fenotipos obvios. Sin embargo, cuando se tienen dobles mutantes en distintas combinaciones de genes ARF se pueden observar claramente varios defectos sobre el desarrollo de las plantas (Okushima *et al.*, 2005).

2.3.8. Ruta de la degradación de proteínas por el proteosoma.

Una de las cascadas de señalización de auxinas mejor caracterizada comprende la modulación a través de la ruta ubiquitina-proteosoma. La ubiquitina es una proteína pequeña que se une covalentemente a diversas proteínas, etiquetándolas para su degradación por un complejo proteico denominado proteosoma 26S el cual se compone de un núcleo ó subunidad grande y dos subunidades pequeñas (Hershko y Ciechanover, 1998). La participación del proteosoma en la degradación de proteínas es importante en una amplia variedad de procesos celulares (Hershko y Ciechanover, 1998).

Esta ruta comienza por la activación de la ubiquitina dependiente de ATP efectuada por la enzima activadora de ubiquitina (E1), la ubiquitina activada es entonces transferida a un segundo componente de la ruta, una enzima conjugadora de ubiquitina (E2). El tercer paso en la reacción de ubiquitinación consiste en la transferencia de ubiquitinas a la proteína blanco mediante la ubiquitina ligasa (E3) que confiere especificidad al sustrato. Finalmente, la proteína ubiquitinizada es degradada por el proteosoma 26S (Hershko y Ciechanover, 1998; Callis y Vierstra, 2000).

Se han identificado cuatro tipos de ligasas E3 en plantas, entre ellas se encuentra el complejo proteico SCF (Skp1-culina-F-caja/RINGH2) (Callis y Vierstra, 2000, Patton *et al.*, 1998). El nombre del complejo proviene de las primeras tres subunidades identificadas en levadura, Skp1 (ASK1), Cdc53 (o culina) y una proteína de la caja F. Se identificó una cuarta subunidad, con un motivo RING-H2 típico de las proteínas Rbx1/Hrt1/ROC1 como un componente esencial del complejo (Tyers y Willems, 1999). En Arabidopsis existen 18 genes relacionados a *Skp1*, 5 culinas y alrededor de 300 proteínas de caja F, siendo estas últimas las que funcionan en el reconocimiento del sustrato y representan los más diversos y específicos componentes del complejo. El alto número de genes que codifican para proteínas que contienen las cajas F, muestra la importancia potencial del complejo SCF y la función que cumple en la degradación de proteínas en varios procesos celulares en plantas (Dharmasiri y Estelle, 2002).

Estudios detallados han demostrado que para la respuesta a auxinas se requiere la participación del complejo SCF^{TIR1} (Gray *et al.*, 1999). *TIR1* codifica para una proteína de 594 aminoácidos que contiene un dominio de caja F y seis repetidos ricos en leucina

(Ruegger *et al.*, 1998). El motivo de caja F está localizado en el extremo N-terminal y se requiere para el ensamblaje de la proteína de caja F con el centro del complejo SCF mediante su unión a las proteínas Skp1 (Patton *et al.*, 1998).

Se ha demostrado que varias proteínas AUX/IAA, como AXR2/IAA7, AXR3/IAA17 y SHY2/IAA3 interactúan con el complejo SCF^{TIR1} cuando estos se añaden a extractos de plantas y que dicha interacción es estimulada por las auxinas (Gray *et al.*, 2001). Una vez formado el complejo AUX/IAA-SCF^{TIR1}, dependiente de auxinas, ocurre la ubiquitinación y degradación de dichas proteínas represoras. En concentraciones bajas de auxinas las proteínas Aux/IAA son degradadas a nivel basal, cuando la concentración de auxinas se incrementa, una interacción eficiente entre proteínas AUX/IAA y TIR1 promueve la degradación de los represores AUX/IAA dando como resultado un incremento en la transcripción regulada por auxinas (Guilfoyle, 2007).

2.3.9. Ruta de transducción de señales de las auxinas.

Hasta hace unos pocos años, no se conocía con exactitud la forma en que ocurría la interacción entre las auxinas, las proteínas AUX/IAA y el complejo SCF^{TIR1}. Se había sugerido que la inducción de las diversas respuestas auxínicas involucraba rutas de transducción de señales múltiples y divergentes (Moller y Chua, 1999; McCarty y Chori, 2000). También se habían identificado cascadas de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) que desempeñaban un papel importante en la señalización por auxinas debido a que mutantes en este tipo de proteínas afectaban múltiples procesos de desarrollo en los cuales las auxinas estaban involucradas (Rogg y Bartel, 2001). También se propuso que las proteínas G heterotriméricas podrían modular varias señales hormonales incluyendo auxinas (Ullah *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2001; Assmann, 2002), debido a que se observó que la subunidad β de las proteínas G heterotrimericas, regulaba negativamente la división celular inducida por auxinas y afectaba múltiples procesos de desarrollo (Ullah *et al.*, 2003). Por otro lado, se había observado que las GTPasas pequeñas del tipo Rac/Rop, miembros de la familia de GTPasas Rho, eran activadas por auxinas y estas a su vez estimulan la expresión de genes de respuesta a auxinas (Li-zhen *et al.*, 2002). Esto sugería que tanto las proteínas G heterotriméricas como las GTPasas pequeñas del tipo Rac/Rop

podrían participar en la ruta de señalización a auxinas, como componentes intermediarios en el proceso de degradación de los represores AUX/IAA por el complejo SCF^{TIR1}. Sin embargo, la identidad del represor requerido para activar estos procesos permaneció desconocida por muchos años. La búsqueda de un receptor de auxinas y los componentes de señalización se había llevado a cabo utilizando prácticamente todos los enfoques experimentales posibles. Los primeros datos obtenidos hasta entonces eran de experimentos bioquímicos encaminados al aislamiento de proteínas que se unían específicamente a auxinas con alta afinidad. Una sola proteína denominada proteína de unión a auxinas (ABP1) se identificó en diferentes especies de plantas, incluido el maíz (Hertel *et al.*, 1972) y *Arabidopsis* (Palme *et al.*, 1992). Sin embargo, a pesar de su fuerte capacidad de unión a la auxinas, el papel fisiológico de ABP1 no quedaba claro (Napier *et al.*, 2002). La mayor concentración de ABP1 se localizaba en el retículo endoplásmico, en donde el pH es demasiado alcalino para una eficiente unión de las auxinas (Henderson *et al.*, 1997). Mediante experimentos con el uso de anticuerpos contra ABP1, así como análisis de expresión se observó que existe una pequeña proporción de esta proteína en la membrana plasmática y por análisis de sobreexpresión de ABP1, se especuló que podría tener un papel en la expansión celular. No obstante no se presentaron evidencias que enlazaran ABP1 a los cambios transcripcionales regulados por auxinas (Steffens *et al.*, 2001; Quint y Gray, 2006). Debido a que la mutante *abp1* es letal, ha sido difícil obtener pruebas genéticas de la participación de ABP1 en los procesos de desarrollo que dependen de auxinas (Chen *et al.*, 2001). Sin embargo recientemente mediante el uso de plantas de *Arabidopsis* afectadas condicionalmente en ABP1 se ha logrado estudiar su posible función y se han presentado evidencias experimentales que sustentan la contribución de ABP1 como un regulador principal en la acción de las auxinas, que controla diversas respuestas inducidas por auxinas (Tomas *et al.*, 2009). Respecto al receptor TIR1 se obtuvo un avance espectacular de su función cuando se estableció un sistema libre de células para estudiar la señalización por auxinas (Dharmasiri *et al.*, 2003). Se observó que la adición de las auxinas a un extracto crudo de plantas promovió la interacción entre las proteínas AUX/IAA y el complejo SCF^{TIR1}, indicando la presencia de un receptor soluble. Posteriormente, dos reportes revelaron la simplicidad de la ruta de auxinas, cuando demostraron con la adición de auxinas marcadas radiactivamente a los extractos crudos de plantas, que la hormona co-

purificaba con el complejo SCF^{TIR1}-AUX/IAA (Kepinski y Leyser, 2005; Dharmasiri *et al.*, 2005a). Además, encontraron que la actividad de unión fue saturable, específica para auxinas activas y posee la afinidad esperada de un receptor de auxinas. Sin embargo, esta evidencia solo sugería, que el receptor formaba parte del complejo SCF^{TIR1}, pero el descubrimiento de que TIR1 al ser expresado en células animales también interactúa con los AUX/IAA en una manera dependiente de auxinas, proporcionó la evidencia adicional de que TIR1 es uno de los receptores de auxinas (Dharmasiri *et al.*, 2005). Tan *et al.*, (2007) establecieron el primer modelo estructural del receptor TIR1-auxinas, donde la estructura cristalográfica de TIR1 mostraron que el dominio de elementos repetidos ricos en leucina del receptor TIR1 formaba una especie de bolsa, la cual contenía como cofactor inositol hexakisfosfato mismo que reconoce a las auxinas y al polipéptido AUX/IAA (Guilfoyle, 2007). Este cofactor se encuentra localizado hacia el fondo de la superficie en forma de bolsa de TIR1 y es el sitio en donde se unen varios análogos de auxinas (IAA, NAA y 2,4-D). Por otra parte, acoplado en la parte superior de la auxina, el sustrato (AUX/IAA) ocupa el resto de la bolsa de TIR1 y termina completando el sitio de unión de la hormona. Las auxinas aumentan las interacciones de TIR1 con su sustrato actuando como un "pegamento molecular", coordinando el ensamblaje del complejo con TIR1 y el dominio II de los AUX/IAA en contacto con la hormona.

El hecho de que las mutantes nulas de *tir1* sean capaces de responder a auxinas, aunque sea de manera disminuída, sugiere que TIR1 no es el único receptor de auxinas. De hecho tres proteínas adicionales AFBs (por AUXIN SIGNALING F BOX), están altamente relacionadas con TIR1 y se demostró recientemente su unión a proteínas AUX/IAA de una manera dependiente de auxinas (Dharmasiri *et al.*, 2005b). El descubrimiento de que las proteínas de caja F (TIR1/AFBs) funcionan como receptores de auxinas fue un hallazgo sorprendente que plantea un nuevo paradigma para la regulación de SCF modulando la ubiquitinación de pequeños ligandos (Fig. 8) (Quint y Gray, 2006).

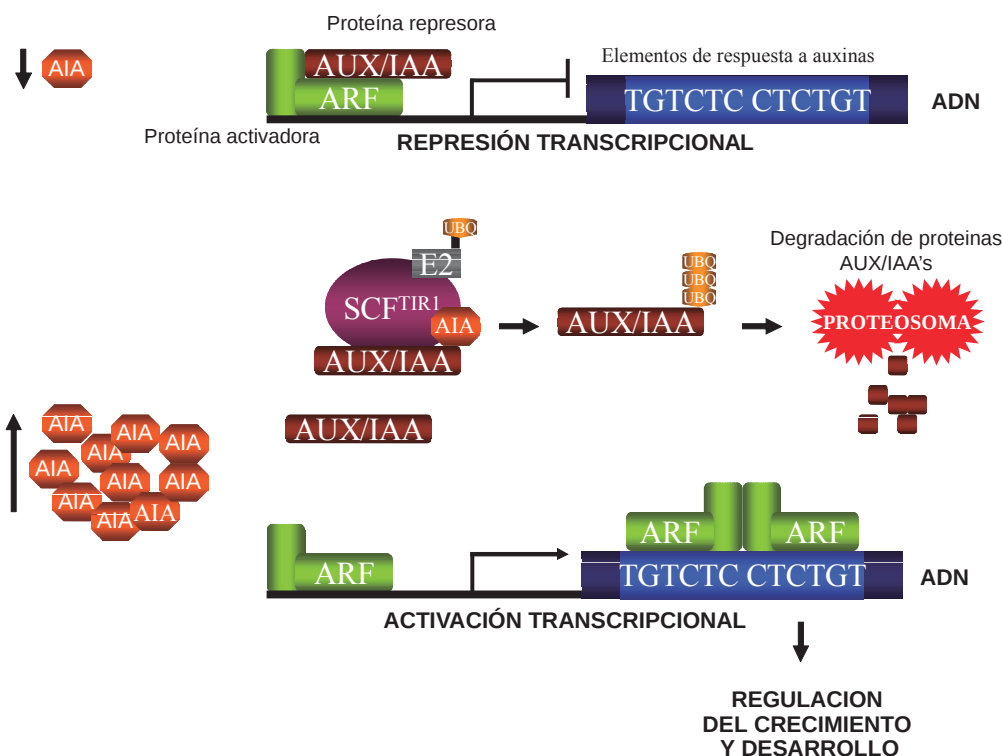


Figura 8. Modelo representativo del mecanismo de señalización de las auxinas. Las proteínas *TIR1/AFB*'s son receptores de auxinas, estas proteínas son componentes del complejo multiproteico *SCF^{F-box}*. En concentraciones bajas de auxinas, las proteínas represoras forman dímeros con las proteínas activadoras bloqueando la transcripción de los genes de respuesta a auxinas. En concentraciones altas de auxinas el AIA estabiliza la unión de las proteínas *AUX/IAA*'s con la proteína F-box en el complejo, resultando en la ubiquitinación de estas proteínas para su posterior degradación por el proteosoma, permitiendo la activación transcripcional dependiente de las proteínas *ARF*'s (Quint y Gray, 2006; Santner *et al.*, 2009).

2.3.10. Promotores inducibles por auxinas.

El análisis de los promotores de varios genes de respuesta a auxinas (como el *GH3*, el *SAUR15A* de soja y el *PS-IAA45* de chícharo) se llevó a cabo mediante el uso de una amplia variedad de métodos genéticos y moleculares (Li *et al.*, 1994, 1999).

Dentro de estos promotores se identificaron secuencias pequeñas de 6 pares de bases (TGTCTC) que son necesarias y suficientes para constituir un promotor de respuesta a auxinas, las cuales se han denominado como elementos de respuesta a auxinas (AuxRE). Se han generado varias construcciones con promotores artificiales que contienen varias copias del motivo AuxRE. Dichas construcciones se han convertido en herramientas poderosas para monitorear los eventos de expresión de genes durante las respuestas de crecimiento y

desarrollo asociadas con cambios en el gradiente o sensibilidad a auxinas, tales como el gravitropismo y el fototropismo (Li *et al.*, 1999). Además, las construcciones con promotores artificiales son útiles en el estudio de rutas de transducción de señales en plantas (Kovtun *et al.*, 2000). Los genes reporteros bajo el control de promotores artificiales que contienen motivos AuxRE responden a auxinas en una amplia variedad de órganos y tejidos. Los dos marcadores más ampliamente utilizados son los denominados *DR5:GUS* y *BA3:GUS*, que han sido expresados en plantas transgénicas de *Arabidopsis* en fusiones transcripcionales con el gen reportero de la beta glucuronidasa (GUS) (Ulmasov *et al.*, 1997b; Oono *et al.*, 1998).

2.4. Antiauxinas.

Las antiauxinas son compuestos que presentan analogía estructural con las auxinas, pero que bloquean sus efectos fisiológicos. Las antiauxinas son compuestos mayoritariamente sintéticos que se utilizan como inhibidores de la acción de las auxinas. Debido a la importancia de las auxinas en el desarrollo de las plantas y gracias al uso de éstas en la agricultura como promotores del crecimiento y herbicidas dependiendo de su actividad y concentración, se han realizado una gran cantidad de investigaciones para la identificación de compuestos con actividad biológica. Los resultados de dichas investigaciones permitieron el descubrimiento de auxinas sintéticas con alta actividad como son el ácido naftalenácético (ANA) y el ácido 2,4-diclofenoxiacético (2,4-D). Por el contrario, existen reportes escasos de compuestos con actividad anti-auxínica, entre estos compuestos se encuentran el ácido *p*-clorofenoxiisobutílico (PCIB), el cual se sabe que antagoniza algunas de las respuestas auxínicas compitiendo directamente por el receptor de auxinas (Oono *et al.*, 2003). Sin embargo, no se ha estudiado a detalle como actúa este compuesto en la planta. Aunque el uso de sustancias que afectan la actividad auxínica, así como el uso de inhibidores del transporte de auxinas como el ácido N-naftilalámico (NPA) y el ácido triyodobenzoico (TIBA) ha proporcionado información importante acerca del mecanismo molecular de la acción de dichas hormonas su función en la planta es cuestionable debido a su origen sintético (Hayashi *et al.*, 2003, 2008).

2.5. La serotonina.

La serotonina es una monoamina derivada del triptófano producida a nivel del sistema nervioso central (SNC) en las células serotoninérgicas, que inicialmente se pensaba era exclusiva de mamíferos. La serotonina funciona como un neurotransmisor en la regulación de funciones fisiológicas importantes como el sueño, la vigilia, el apetito, la temperatura corporal, el humor, el comportamiento, la contracción muscular, la depresión entre otras (Frazer y Hensler, 1999). La serotonina también contribuye en la síntesis de otras hormonas como la melatonina, ya que es su precursor directo en una vía común dependiente de triptófano. Además de su función neurotransmisora, la serotonina también es un mediador periférico de señales, que se sintetiza en las células entéricas del tracto gastrointestinal y se almacena en las plaquetas en la circulación sanguínea (Berger *et al.*, 2009).

2.5.1. Señalización de la serotonina en animales.

En animales las funciones de la serotonina ocurren por su interacción con proteínas receptoras específicas. Varios de los receptores de serotonina han sido identificados y se han clasificado en siete grupos conocidos como 5HT1, 5HT2, 5HT3, 5HT4, 5HT5, 5HT6, y 5HT7. Dichos grupos a su vez se dividen en subgrupos (Nichols y Nichols, 2008). Los grupos 5HT1, 2, y 4-7, son receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas que actúan vía sistemas de segundos mensajeros, afectando las actividades de la adenilato ciclasa o fosfolipasa C γ (PLC γ) para causar la respuesta postsináptica (Hannon y Hoyer, 2008). Mientras que los receptores del grupo 5HT3 son canales iónicos permeables a los iones de sodio, potasio y calcio. Algunos de los diferentes grupos y subgrupos de receptores han sido implicados en funciones específicas. El receptor 5HT2A media la agregación plaquetaria y la contracción del músculo liso, el 5HT2C se cree que actúa en el control de la ingesta alimenticia ya que ratones que carecen de este gen, llegan a ser obesos por la creciente ingesta de comida. Los receptores 5HT3 están presentes en el tracto gastrointestinal y se relacionan con el vómito, también en el tracto gastrointestinal están los receptores 5HT4 regulando la secreción y movimientos peristálticos intestinales y los

receptores 5HT6 y 5HT7 están distribuidos a través del sistema límbico del cerebro modulando las respuestas inducidas por la serotonina a nivel del sistema nervioso central (Bubar y Cunningham, 2006).

2.5.2. La serotonina en las plantas.

La serotonina es un compuesto que inicialmente se creía exclusivo de mamíferos, sin embargo, existe información que indica que es una molécula ubicua. En plantas se ha encontrado en más de 42 especies (Bowden *et al.*, 1954; Roshchina 2001). Aparentemente los frutos y las semillas son los principales tejidos en los que se acumula, aunque su contenido varía enormemente entre cada especie y tejido, en un rango de 0.007 µg/g en hojas frescas de lechuga hasta 2,000 µg/g en semillas de *Griffonia simplicifolia* (Fellows y Bell, 1970). A pesar de su amplia distribución en las plantas, a la fecha se desconocen las funciones fisiológicas en los que participa, aunque se ha reportado su actividad como un regulador del crecimiento, estimulando el desarrollo de las raíces y la germinación de las semillas en cebada (Csaba y Pal, 1982). Otras funciones en que está implicada la serotonina es la exudación de savia por las raíces, la floración, la permeabilidad de iones y como un antioxidante (Odjakova y Hadjiivanova, 1997; Roshchina, 2001). En la morfogénesis, dicha molécula modula la organogénesis de la raíz inducida por auxinas a partir de explantes en *Hypericum Perforatum* L. (Murch *et al.*, 2001). Recientemente, se describió que la serotonina participa en la inhibición del proceso de senescencia, debido a que en plantas de arroz (*Oryza sativa*), ésta se acumula mayoritariamente en las hojas senescentes retardando este proceso, posiblemente por mantener la integridad celular a través de una función antioxidante de la serotonina y por consecuencia facilitando un reciclamiento eficiente de los nutrientes de las hojas senescentes a los tejidos en desarrollo (Kang *et al.*, 2009a). También en plantas de arroz se ha sugerido que la serotonina es importante en el establecimiento de respuestas de defensa ante la infección por el hongo patógeno *Bipolaris oryzae*, debido a que se acumula en las hojas infectadas con el hongo. También se observó que el tratamiento con serotonina suprime el crecimiento de las hifas del hongo indicando con ello una participación de dicha sustancia en respuestas de defensa ante el ataque de patógenos (Ishihara *et al.*, 2008). Sin embargo, a pesar de la creciente evidencia que

involucra a la serotonina en diversos procesos en las plantas, aun no se han determinado los mecanismos moleculares por los que ocurren estos procesos.

2.5.3. Biosíntesis de serotonina en las plantas y en los animales.

Como se mencionó anteriormente, la serotonina al igual que el AIA se sintetiza a partir de una ruta dependiente de triptófano, tanto en animales como en plantas. En animales su síntesis ocurre por dos pasos enzimáticos, en los que participan las enzimas triptófano 5-hidroxilasa (TPH) y la aromático amino-ácido descarboxilasa (AADC). La primera enzima funciona como paso limitante en la síntesis de serotonina (Fig. 9) (Veenstra-VanderWeele *et al.*, 2000). A pesar de los escasos estudios sobre la serotonina en plantas, actualmente se han logrado identificar y caracterizar las enzimas involucradas en su síntesis en plantas de arroz permitiendo así establecer una ruta biosintética. A diferencia de los animales, en las plantas las enzimas involucradas son la triptófano descarboxilasa (TDC) que cataliza el primer paso y la enzima triptamina 5-hidroxilasa (T5H) el segundo, para dar como producto a la 5-hidroxitriptamina o serotonina (Fig. 9). En esta vía de síntesis, el primer paso mediado por TDC, funciona como paso limitante de la vía (Murch *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2007 a,b; Kang *et al.*, 2008).

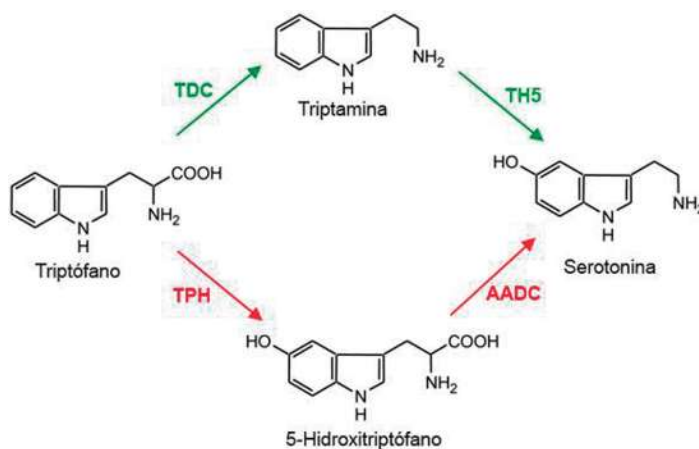


Figura 9. Biosíntesis de la serotonina en las plantas y en los animales. En animales como en plantas la síntesis ocurre partir del triptófano por dos pasos enzimáticos. En plantas (ruta en verde) la triptófano descarboxilasa (TDC) cataliza la conversión del triptófano a triptamina y la triptamina 5-hidroxilasa (T5H) cataliza la conversión de la triptamina en serotonina. En animales (ruta en rojo) la triptófano 5-hidroxilasa (TPH) cataliza la conversión de triptófano a 5-hidroxitriptófano en el primer paso y la aromático amino-ácido descarboxilasa (AADC), cataliza la conversión de este ultimo en serotonina (Modificado de Kang *et al.*, 2007a).

3. JUSTIFICACIÓN.

La información generada sobre los mecanismos de señalización de las auxinas y su efecto sobre el desarrollo de las plantas ha representado un aporte importante al conocimiento científico en las dos últimas décadas. Esto ha sido posible gracias al uso de plantas modelo en investigación como *Arabidopsis thaliana*. La identificación de nuevas moléculas con actividad biológica, presentes de manera natural en los tejidos vegetales, y que además poseen la capacidad de afectar la respuesta a auxinas, representan una herramienta con grandes aplicaciones en el ámbito de la biotecnología, debido a que podrían ser utilizados para modificar la arquitectura de la raíz y del follaje. Estos compuestos también podrían servir para estudiar la contribución de las auxinas en las diferentes respuestas adaptativas de las plantas.

La serotonina como se mencionó anteriormente, es un compuesto estructuralmente relacionado al AIA, que al igual que este último también es sintetizada a partir del triptófano, además de que se encuentra presente de manera natural en las plantas. En este escenario, la serotonina representa un compuesto de gran interés para estudiar y elucidar los procesos morfogénéticos modulados por las auxinas en *Arabidopsis thaliana*.

4. OBJETIVOS.

4.1. Objetivo general.

Caracterizar el efecto de la serotonina sobre la arquitectura de la raíz y la respuesta a auxinas en *Arabidopsis thaliana*.

4.2. Objetivos particulares.

- 1) Evaluar el efecto de la serotonina sobre la arquitectura de la raíz en *Arabidopsis thaliana*.
- 2) Determinar la capacidad de las plantas silvestres de *Arabidopsis* de captar serotonina del medio y cuantificar su acumulación en los tejidos vegetales.
- 3) Analizar los efectos de la serotonina sobre la expresión de genes regulados por auxinas.
- 4) Caracterizar el efecto de la serotonina sobre el crecimiento de la raíz de mutantes afectadas en el transporte y la respuesta a auxinas.
- 5) Determinar el efecto de la serotonina sobre la viabilidad celular.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1. Material biológico.

Para la realización de los diferentes experimentos en este trabajo se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0, así como de las líneas transgénicas *HS::AXR3NT-GUS* (Gray *et al.*, 2001), *DR5:uidA* (Ulmasov *et al.*, 1997b), *BA3:uidA* (Oono *et al.*, 1998), *PRZ1:uidA* (Sieberer *et al.*, 2003), *EXP7:uidA* (Cho y Cosgrove, 2002) *CycB1:uidA* (Colón-Carmona *et al.*, 1999) y *AtH2B:YFP* (Boisnard-Lorig *et al.*, 2001). Además se ensayaron las mutantes afectadas en la respuesta y/o transporte de auxinas *axr1-3* (Lincoln *et al.*, 1990), *aux1-7* (Pickett *et al.*, 1990), *axr2-1* (Timpte *et al.*, 1994) y *axr4-1* (Hobbie y Estelle 1995).

5.2. Desinfección de las semillas.

Tanto con fines de propagación como para estudiar la respuesta a los diferentes reguladores del crecimiento, las semillas requirieron de esterilización superficial. Esta se realizó de la siguiente manera: las semillas se colocaron en tubos Eppendorf a los cuales se les agregó 1 mL de alcohol etílico, y se sometió a agitación durante 8 min. Posteriormente se descartó el etanol y se le agregó 1 mL de una solución de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex) al 20 %, manteniéndose en agitación por 5 min, transcurrido este tiempo, se decantó el cloro y se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril y finalmente se colocaron a 4° C durante al menos 48 horas previo a la siembra de la semilla para promover y homogenizar su germinación.

5.3. Condiciones de crecimiento.

Las semillas se siembran y cultivan bajo condiciones de esterilidad en cajas de Petri con 30 ml de medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) 0.2X, el cual contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas, suplementado con 0.6 % de sacarosa y 1% de agar. El pH del medio se ajustó a 7.0 con hidróxido de potasio 0.1N. Una vez preparado el

medio se sometió a esterilización en el autoclave (120°C y 15 Lb de presión durante 20 min). El medio MS contiene los siguientes componentes: NH_4NO_3 2.0 mM, KNO_3 1.9 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 mM, KI 5 μM , H_3BO_3 25 μM , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1 mM, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 mM, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 μM , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.1 μM , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1 μM , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 mM, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 mM, inositol (10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) y Gli (0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Después de la siembra de las semillas, las cajas son llevadas a la cámara de crecimiento con ambiente controlado con un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h de oscuridad, a una temperatura de 22 °C y humedad del 80 %, colocando las cajas en posición vertical con un ángulo de 65° de inclinación en la cámara de crecimiento Percival AR95L. Es importante mencionar que para cada uno de los bioensayos, el medio de cultivo fue suplementado con los reguladores utilizados (AIA, ANA y Serotonina) en las concentraciones que se indican para cada uno en los diferentes experimentos, esto después de la esterilización del medio. La serotonina, el AIA y el ANA fueron preparados disolviéndolos en DMSO (Dimetil sulfóxido), por lo que a todos los controles se les adiciona DMSO en un volumen equivalente al de la concentración más alta del compuesto en el bioensayo. Dichos compuestos fueron adquiridos en la casa comercial Sigma (Sigma Aldrich, St, Louis MI, USA).

5.4. Crecimiento en suelo.

El sustrato utilizado para la propagación de plantas de *Arabidopsis* consiste en una mezcla (partes iguales) de vermiculita, perlita y suelo orgánico (Sunshine). Previamente a su uso, esta mezcla se esteriliza en autoclave. El trasplante se realiza cuando las plantas germinadas *in vitro* han formado las dos primeras hojas. Las macetas se cubren para mantener las condiciones de humedad adecuadas y se transfieren a cámaras de crecimiento vegetal con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad. Las plantas se mantienen a capacidad de campo mediante riego con agua destilada o solución nutritiva Murashige y Skoog.

5.5. Variables de crecimiento.

Las variables de crecimiento y desarrollo que se analizaron en los bioensayos fueron la longitud de la raíz primaria, el número de raíces laterales, 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. 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 10 plantas por placa para cada uno de los tratamientos. La densidad de las 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. Los pelos radicales fueron cuantificados y medidos a partir de una región de 500 μm de la raíz primaria y el promedio de la longitud de los pelos fue determinado por la medición de 100 pelos, tomando como referencia el plano protoxilemático para localizar la base del pelo en la célula epidérmica. El análisis de raíces adventicias a partir de explantes de tallo se realizó únicamente cuantificando el número de raíces formadas a lo largo de los explantes los cuales presentaban una longitud aproximada de 1.0 cm.

5.6. Determinación de las etapas del desarrollo de los primordios de raíces laterales.

Los primordios de las raíces laterales fueron cuantificados 7 días después de la germinación en cada una de las condiciones de crecimiento indicadas. Las plantas fueron clarificadas para poder visualizar y cuantificar los primordios en las diferentes etapas de su desarrollo. Cada una de las etapas del desarrollo de los primordios fueron clasificadas de acuerdo al protocolo reportado por Malamy y Benfey (1997a), el cual considera las siguientes etapas de desarrollo: Etapa I: comprende la iniciación del primordio en un plano longitudinal con aproximadamente 8 divisiones a partir de una de las células del periciclo. Etapa II: el primordio consta de dos capas celulares causado por una división periclinal de la primera capa de células. Etapa III: se lleva a cabo otra división periclinal para dar la formación de una tercera capa de células. Etapa IV: el primordio consiste de cuatro capas de células. Etapa V: el primordio alcanza el córtex de la raíz. Etapa VI: el primordio forma un domo

que alcanza la epidermis. Etapa VII: ocurre la emergencia de la raíz primaria formándose una nueva raíz lateral.

5.7. Análisis histoquímico de actividad de GUS y clareo de tejidos.

Para los análisis histoquímicos de GUS, las plántulas se incubaron toda la noche a 37°C en el amortiguador de reacción de GUS que contenía (0.5 mg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucoronido en NaHPO₄ 100 mM, pH 7.0; β -mercaptoetanol 10 mM; EDTA 10 mM; N-lauril-sarcosina 0.1%; Tritón X-100 0.1 %, que también contiene el catalizador de la oxidación (Ferri y ferrocianuro de potasio 5 mM) (Jefferson *et al.*, 1987).

La clarificación de las plántulas se realizó de acuerdo al protocolo de Malamy y Benfey (1997a). que consiste en los siguientes pasos: se elimina el buffer de tinción de GUS y se agrega un volumen de HCl 0.24 N en metanol al 20% colocando la muestra a 57 °C durante 60 min., transcurrido este tiempo se decanta la solución y se agrega un volumen de NaOH al 7% en etanol al 60% durante 20 min manteniendo la muestra a temperatura ambiente. Posteriormente, se agrega un volumen de etanol al 40, 20 y 10% sucesivamente por 15 min c/u y en este último sin decantar se agrega un volumen de glicerol al 50% por 1 h. Finalmente se elimina esta solución y se añade un volumen de glicerol al 50% en cuya solución la muestra puede ser almacenada hasta tres semanas. Para cada línea marcadora y cada tratamiento al menos 15 plantas fueron analizadas.

5.8. Análisis de estabilidad de la proteína AXR3/IAA17.

Para el análisis de la degradación de la proteína AXR3, se crecieron plantas de la línea transgénica *HS::AXR3NT-GUS* por 7 días en medio MS 0.2X. Las plantas de *HS::AXR3NT-GUS* se sumergieron en medio líquido y se les dio un choque térmico por 2 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo, para los tratamientos con auxinas se les agregó el disolvente, AIA y/o serotonina durante diferentes periodos de tiempo (10, 30 y 60 min) y posteriormente se tomaron muestras de las plantas a los 20, 40 y 60 min inmediatamente después del choque térmico. Transcurridos estos tiempos, las plantas fueron lavadas con medio MS 0.2X líquido y teñidas para la actividad de GUS durante las siguientes 14 horas.

5.9. Cuantificación de serotonina por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

La identificación y cuantificación de serotonina se realizó a partir de la raíz y el follaje de plantas de *Arabidopsis thaliana* control o tratadas con diferentes concentraciones de serotonina. El material congelado se molió en un mortero con N₂ líquido hasta obtener un polvo fino, el cual se extrajo utilizando 3 ml de metanol, agitando la muestra durante 3 horas. Posteriormente, las muestras se desecaron con nitrógeno gas y se sometieron a un proceso de derivatización que consistió en acetilar la serotonina con la adición de 1.5 ml de anhídrido acético y 1 ml de diclorometano para inmediatamente sonicar por 15 minutos e incubar a 75 °C por 1.5 horas. Al final de este proceso, la serotonina presente en las muestras se transforma en N-acetilserotonina. Las muestras derivatizadas se resuspenden en 50 µl de diclorometano. La N-acetil serotonina se analizó en un cromatógrafo de gases Agilent 6850 serie II equipado con un detector MS Agilent modelo 5973 y una columna capilar de 30 m x 0.2 mm x 0.25 mm, 5 % fenil metil silicona (HP-5 MS). Durante el análisis se utilizó helio como gas acarreador (1 ml/min⁻¹), una temperatura del detector de 300 °C y 250 °C del inyector. El volumen de la muestra fue de 1 µl. La columna se calentó por 3 min a 150 °C y se programó el equipo para incrementar 5 °C/min hasta alcanzar una temperatura final de 278 °C. La N-acetil serotonina se identificó por la comparación de la muestra con una librería de espectros de masas (IST/EPA/NIH, “Chem Station” Hewlett Packard). Además de confirmar esta identidad por la comparación del tiempo de retención de las muestras con el del estándar de serotonina puro (SIGMA), derivatizado siguiendo el mismo procedimiento anteriormente mencionado. Se realizó un análisis SIM para verificar la presencia de este compuesto en las muestras. Los iones moleculares fueron monitoreados después de la ionización de impacto de electrones (70-eV). Estos iones fueron m/z 218, m/z 159 y m/z 146. Para estimar la cantidad de serotonina presente en la planta se realizó una curva de calibración para el estándar derivatizado usando concentraciones desde 0.1 hasta 30 µg.

5.10. Microscopía.

El sistema radicular de *Arabidopsis thaliana* se analizó con un microscopio estereoscópico (Leica MZ6). El número de raíces laterales se contaron a un aumento de 30X. Los primordios de la raíz primaria y de las raíces laterales se analizaron en preparaciones semi-permanentes de raíces utilizando un microscopio compuesto Axiostar Zeiss Plus en aumentos de 10X o 40X. Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital SONY Cybershot DSC-S75 adaptada al microscopio y procesadas con el software Zeiss Axio Vision 4AC.

5.11. Detección de la proteína amarillo fluorescente (YFP) y tinción con yoduro de propidio (IP).

Para la detección de la proteína YFP se utilizó la línea transgénica de *Arabidopsis AtH2B:YFP*. Para la tinción fluorescente con yoduro de propidio (IP) se colocaron plántulas de esta línea transgénica que fueron crecidas en ausencia de serotonina o en concentraciones crecientes de este compuesto, las cuales fueron incubadas en una solución de IP (10 mg ml⁻¹) durante 3 minutos. Posteriormente, las plantas fueron lavadas con agua destilada esterilizada y fijadas en glicerol al 50% sobre un portaobjeto. Cada una de estas muestras fue analizada de manera independiente en longitudes de onda específicas que permiten la fluorescencia del IP (568 nm de excitación y 585-610 nm de emisión) mientras que para la YFP fueron 485 nm de excitación y 505-550 nm de emisión y cada una de las imágenes se traslapan para formar la imagen final.

5.12. Análisis de datos.

El sistema radicular de *Arabidopsis* fue visualizado con un estereoscopio (Nikon) AFX-II-A. Para todos los experimentos los datos se analizaron estadísticamente en el programa SPSS 10 (SPSS). Todos los datos fueron analizados por univarianza y multivarianza y sometidos a una prueba post hoc Tukey para determinar las diferencias en las respuestas evaluadas en las plantas tratadas con respecto al control. En las gráficas, las diferentes letras indican las medias que difieren significativamente ($P < 0.05$).

6. RESULTADOS.

6.1. Efecto de la serotonina sobre la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

La información existente respecto a los mecanismos de acción de la serotonina en las plantas es escasa. Debido a que esta molécula comparte similitud estructural con el AIA y considerando la relevancia que pudiera tener su presencia en las plantas, sobre la regulación del crecimiento resulta interesante profundizar en el estudio de este campo. En este trabajo, utilizamos plantas de *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo para evaluar los efectos de la serotonina sobre el crecimiento y desarrollo vegetal. Las semillas de *Arabidopsis* del ecotipo Columbia (Col-0) fueron germinadas y crecidas en cajas de Petri con medio de Murashige y Skoog (MS) 0.2X solidificado con agar y suplementado con el solvente o con concentraciones crecientes de serotonina desde 10 hasta 160 μM . A los doce días después de la germinación (12 ddg) se cuantificó el crecimiento de la raíz primaria, el número de raíces laterales y la densidad de raíces laterales a 30 plantas de cada tratamiento. Se encontró que la serotonina no presenta un efecto significativo sobre el crecimiento de la raíz primaria aún en concentraciones de 160 μM (Fig. 10 A). Sin embargo, promovió el desarrollo de raíces laterales significativamente desde la concentración de 10 μM hasta 160 μM (Fig. 10 B) lo cual fue más evidente al graficar la densidad de raíces laterales (Fig. 10 C). El efecto promotor sobre la formación de raíces laterales sin afectar el crecimiento de la raíz primaria se muestra en las fotografías representativas en la Figura 10 D.

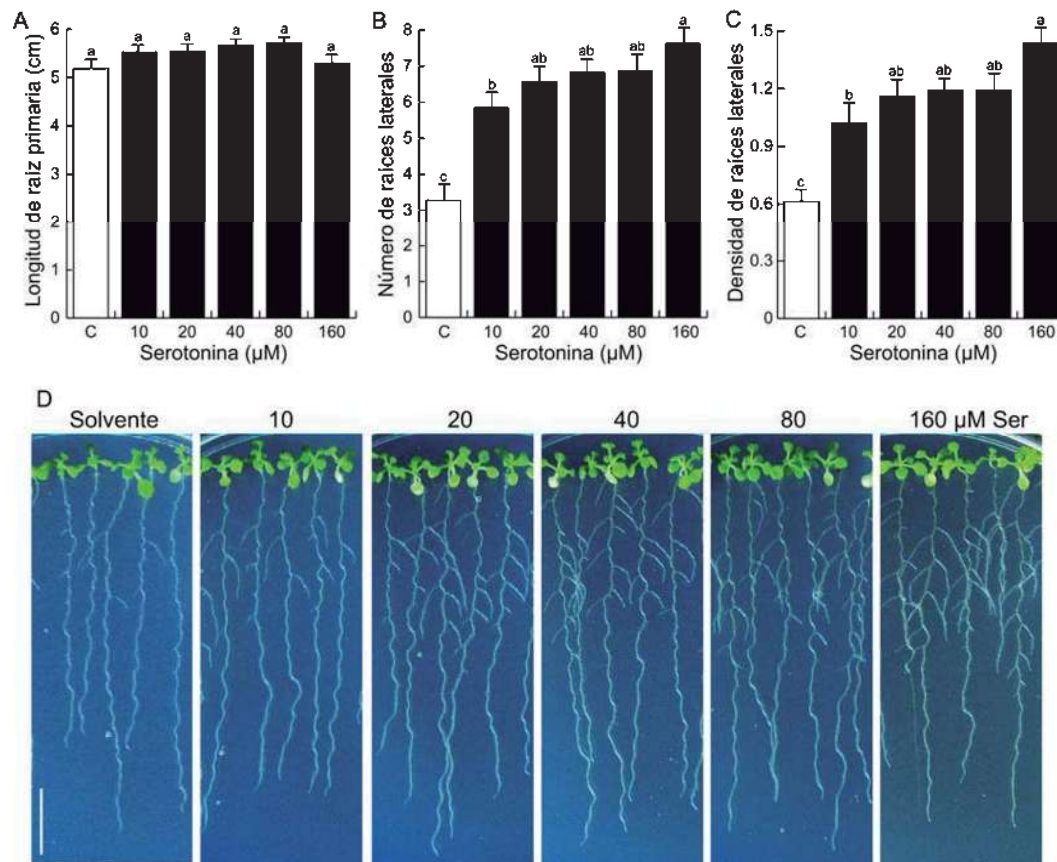


Figura 10. Efecto de bajas concentraciones de serotonina sobre la arquitectura del sistema radicular de *Arabidopsis thaliana*. (A) crecimiento de la raíz primaria, (B) número de raíces laterales, (C) densidad de raíces laterales, (D) fotografías representativas de los diferentes tratamientos. Se graficó la media $\pm$ desviación estándar ($n=30$). Las distintas letras indican una diferencia estadística con una $P < 0.05$. El experimento fue repetido tres veces con resultados similares.

Una característica importante del desarrollo que se utiliza ampliamente para monitorear la respuesta a auxinas es el crecimiento de la raíz primaria (Woodward y Bartel, 2005). Para determinar si tratamientos de serotonina mayores a 160 μM podrían afectar el crecimiento de la raíz primaria y otros parámetros de la arquitectura de la raíz, de manera similar a las auxinas, se evaluó el efecto de la serotonina en concentraciones desde 150 hasta 600 μM sobre el la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis*. Como se observó previamente, en las plantas tratadas con 150 μM se promueve la formación de raíces aumentando el número y la densidad de estas estructuras sin afectar el crecimiento de la raíz primaria. Sin embargo, concentraciones mayores como 300 μM se inhibió el crecimiento de la raíz primaria cerca

de 50% (Fig. 11 A). A diferencia del efecto observado en concentraciones bajas la serotonina, se disminuyó la formación de raíces laterales significativamente en concentraciones de 300 μM en adelante (Fig. 11 B-C).

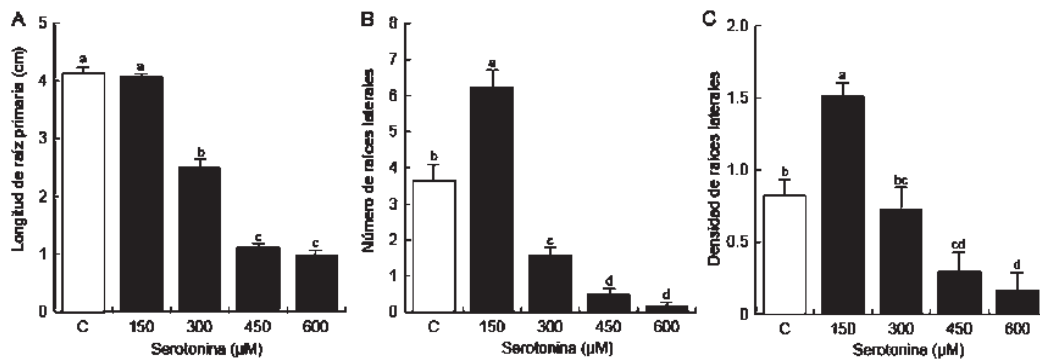


Figura 11. Efecto de altas concentraciones de serotonina sobre la arquitectura del sistema radicular de *Arabidopsis thaliana*. Las semillas fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X bajo diferentes tratamientos de serotonina o en medio suplementado con el solvente y a los 12 días después de la germinación se cuantificaron las siguientes variables: (A) crecimiento de la raíz primaria, (B) número de raíces laterales, (C) densidad de las raíces laterales. Los valores mostrados representan la media $\pm$ desviación estándar ($n=30$). Las distintas letras indican una diferencia estadística con una $P < 0.05$. El experimento fue repetido tres veces con resultados similares.

Adicionalmente, se encontró que también en estas condiciones la serotonina promovió la formación de raíces adventicias de manera dependiente de la concentración, como se puede apreciar en las fotografías de la Fig. 12, en donde se observa como la serotonina promueve la proliferación de raíces adventicias originadas a partir de la zona de transición entre la raíz y el tallo aumentando la ramificación de las plantas con respecto a las que se crecieron sin serotonina. El conjunto de estos efectos resultados muestran que la serotonina tiene un efecto dual sobre la arquitectura del sistema radicular, promoviendo el desarrollo de raíces laterales en concentraciones bajas (10 a 160 μM) y de raíces adventicias aún en concentraciones de 450 μM , pero inhibiendo el crecimiento de la raíz primaria y el desarrollo de raíces laterales en concentraciones mayores a 160 μM .

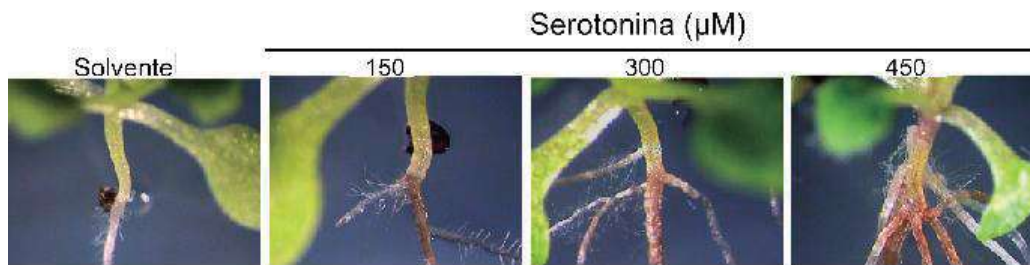


Figura 12. Efecto de la serotonina en el desarrollo de raíces adventicias. Se muestran fotografías representativas de plantas individuales de la zona de formación de raíces adventicias en plantas tratadas con el solvente y en presencia de concentraciones crecientes de serotonina.

6.2. Efecto de la serotonina sobre el crecimiento y la división celular en raíces de *Arabidopsis*.

Los efectos de la serotonina en altas concentraciones sobre el desarrollo post embrionario de la raíz de *Arabidopsis* sugería que este compuesto podría estar afectando la división celular y/o la elongación celular. A continuación se investigó el efecto de la serotonina sobre la división y elongación celular para lo cual se midió la longitud de células corticales totalmente desarrolladas a partir de la región de diferenciación de la raíz primaria, así como la longitud del meristemo en plantas de 7 ddg crecidas en diferentes concentraciones de serotonina (Fig. 13 A y B). También analizamos plantas transgénicas que expresan *pPRZ1:uidA* un marcador de actividad meristemática y de *CycB1:uidA* un marcador de actividad mitótica que se expresa solo en la fase G2/ M del ciclo celular. La inhibición en el crecimiento de la raíz primaria de plantas tratadas con 300, 450 y 600 μM de serotonina coincidió tanto con la disminución del tamaño de las células corticales como con la pérdida de la expresión de GUS en el meristemo de la raíz primaria en *pPRZ1:uidA* (Fig. 13 C-G) y en *CycB1:uidA* (Fig.13 H-L). La longitud del meristemo disminuyó significativamente de 300 μm en plantas tratadas con el solvente hasta 220 μm en concentraciones de 600 μM de serotonina. Estos resultados indican que la serotonina inhibe el crecimiento de la raíz primaria por afectar tanto la división como la elongación celular en la raíz de plantas de *Arabidopsis*.

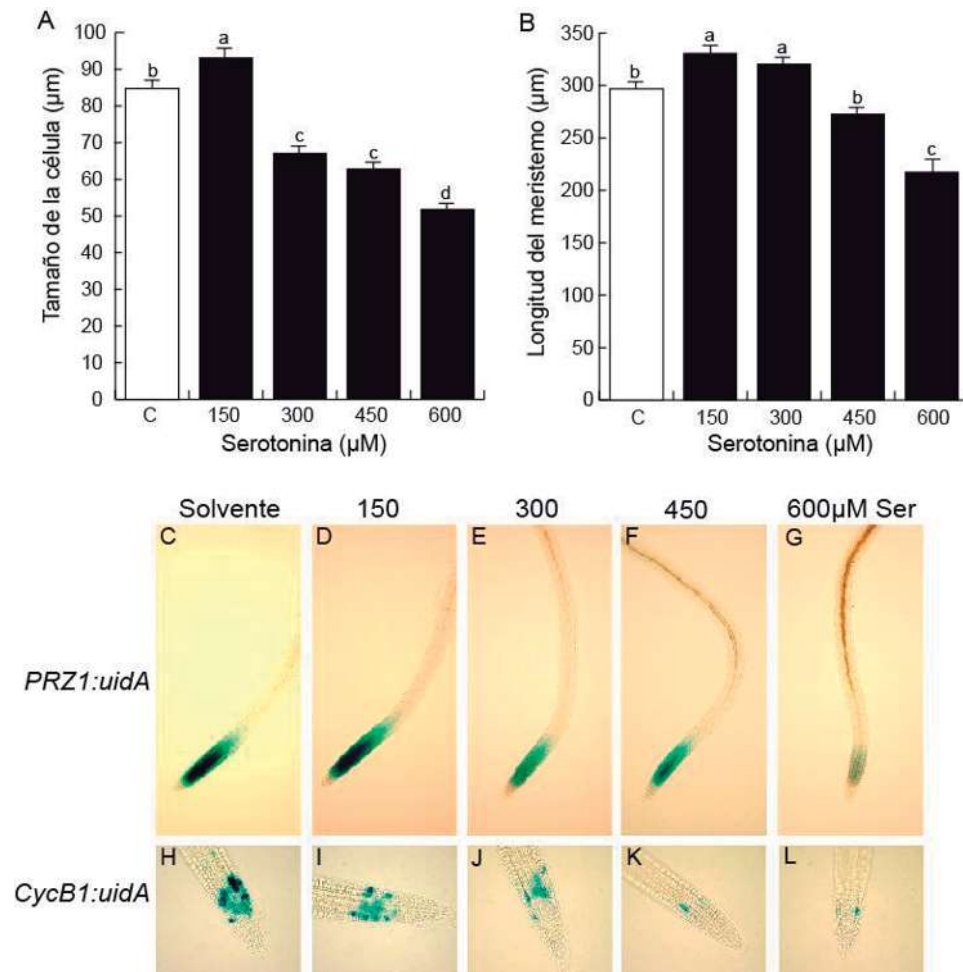


Figura 13. Efecto de la serotonina sobre la división y elongación celular. Semillas de *Arabidopsis* Col-0, *pPRZ:uidA*, y *CycB1:uidA* fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X suplementado con las concentraciones de serotonina indicadas por 7 días. (A) tamaño de células corticales, (B) longitud del meristemo. Las plantas se procesaron para determinar la actividad de β -glucuronidasa y se clarificaron para mostrar la expresión del gen GUS. (C-G) *pPRZ:uidA*, (H-L) *CycB1:uidA*. Las fotografías son representativas de al menos 15 plantas. Las distintas letras indican una diferencia estadística con una $P < 0.05$.

6.3. Efecto de la serotonina sobre la formación de primordios de raíces laterales.

Para esclarecer si el efecto promotor de la serotonina sobre la formación de raíces laterales en concentraciones de 150 μ M se debe a una estimulación en el crecimiento de primordios preexistentes o a la inducción de *novo* de primordios, se analizaron las diferentes etapas de desarrollo de los primordios de raíces laterales en respuesta a la serotonina. Los primordios

de raíces laterales se cuantificaron a los 7 ddg en plantas tratadas con el solvente o con 150 μ M de serotonina, ya que esta concentración aumenta el número y densidad de raíces laterales sin afectar el crecimiento de la raíz primaria (Figs. 10 y 11). La raíz de las plantas se clarificó para permitir la visualización de los primordios y la cuantificación de las diferentes etapas del desarrollo de los primordios de acuerdo al protocolo reportado por Malamy y Benfey (1997a). Se encontró que la serotonina afecta en particular las etapas 1 y 7; en la etapa 1 se presentaron un número menor de primordios en el tratamiento con serotonina (Fig. 14 A), mientras que la etapa 7 presentó un incremento de alrededor de 3 veces. El número total de primordios por planta no cambió en el tratamiento con serotonina (Fig. 14 B). Estos datos sugieren que la serotonina no induce la iniciación de *novi* de primordios y que probablemente su actividad promotora de la formación de raíces laterales se debe a que promueve la maduración de primordios preformados a partir de las células del periciclo.

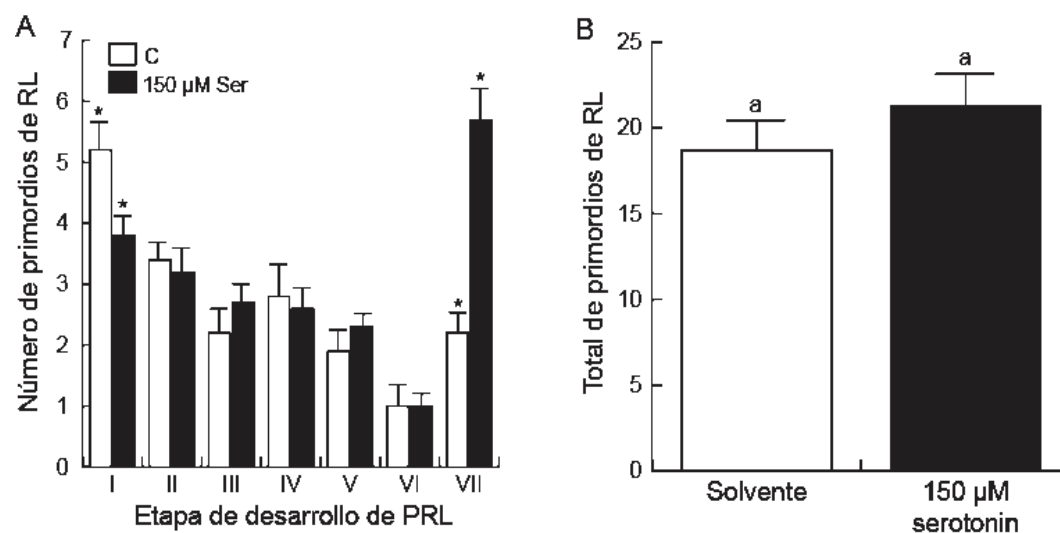


Figura 14. Efecto de la serotonina sobre el desarrollo de primordios de raíces laterales. Las semillas de *Arabidopsis* (Col-0) se germinaron y crecieron por 7 días en medio MS 0.2X suplementado con el solvente o con 150 μ M de serotonina (A) número de primordios de raíces laterales (PRL) por planta en los diferentes etapas de desarrollo, (B) total de PRL por planta. Las etapas de desarrollo de los PRL se reportan según Malamy y Benfey (1997a). Los valores representan la media $\pm$ desviación estándar de 15 plantas analizadas. El experimento fue realizado dos veces con resultados similares.

6.4. Efecto de la serotonina sobre la organogénesis de raíces adventicias a partir de explantes del tallo.

Para determinar si la serotonina además de participar en la regulación de los procesos del desarrollo en el sistema radicular, también es capaz de modular eventos de regulación en el sistema vegetativo, se evaluaron sus propiedades regenerativas cultivando explantes de tallo de plantas etioladas en concentraciones crecientes de serotonina y monitoreando la formación de raíces adventicias de acuerdo a lo reportado por Campos-Cuevas et al. (2008). Los explantes tratados con 150-600 μM de serotonina mostraron un aumento de 2 veces en el número de raíces adventicias que los explantes tratados únicamente con el solvente (Fig. 15 A). En los paneles B y C de la Fig. 15 se presentan fotografías representativas. Estos resultados muestran que la serotonina es un compuesto con fuerte actividad sobre la organogénesis de raíces adventicias en *Arabidopsis*.

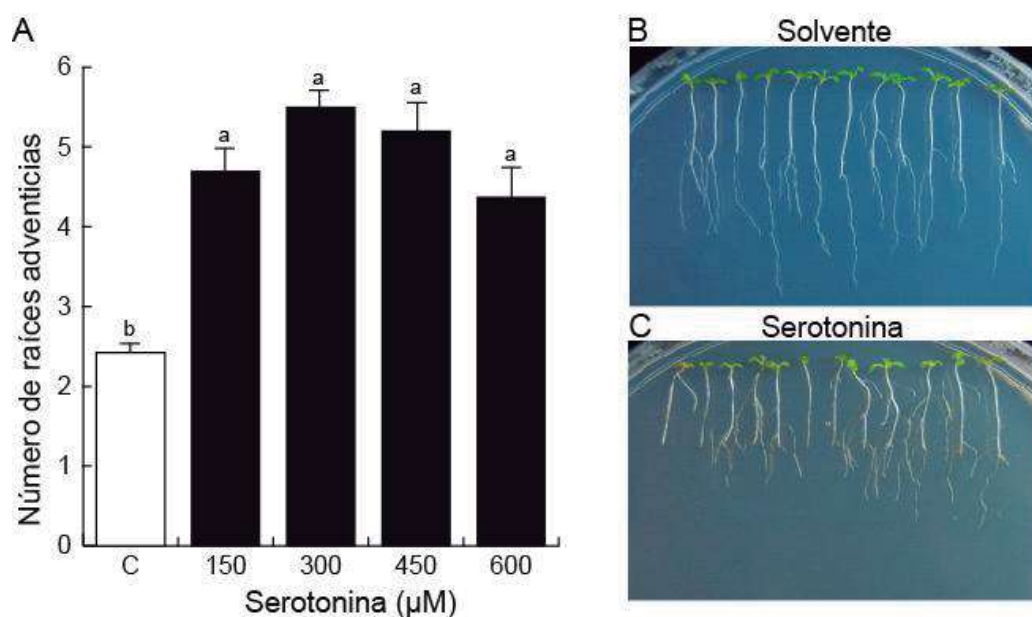


Figura 15. Efecto de la serotonina sobre el desarrollo de raíces adventicias a partir de explantes de tallo de *Arabidopsis*. Las semillas de *Arabidopsis thaliana* fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X durante 5 días en condiciones de oscuridad para la obtención de los explantes de tallo, los cuales se cultivaron por 9 días en medio con los diferentes tratamientos de serotonina y se cuantificó la formación de raíces adventicias. (A) Número de raíces adventicias, (B) fotos representativas de explantes tratados con el solvente, o (C) con 450 μM de serotonina. La gráfica muestra la media $\pm$ desviación estándar ($n=20$). Las distintas letras indican una diferencia estadística con una $P < 0.05$. El experimento fue repetido tres veces con resultados similares.

6.5. Efecto de la serotonina sobre el desarrollo de los pelos radiculares y la expresión del gen de la expansina 7.

La inhibición en el crecimiento de la raíz primaria y la estimulación de raíces adventicias son similares a los reportados para las auxinas. Las auxinas además de participar en la formación de raíces laterales y adventicias también inducen el desarrollo de pelos radiculares en muchas especies de plantas. Para determinar si la serotonina era capaz de afectar el desarrollo de los pelos radiculares en *Arabidopsis*, se estudió el desarrollo de los pelos radiculares de la zona de diferenciación y maduración de la raíz primaria. En este caso, contrario al desarrollo de raíces adventicias inducido por la serotonina, la formación de los pelos radiculares fue inhibida dramáticamente tanto en la zona de diferenciación como en la zona de maduración de la raíz en respuesta a los tratamientos (Fig. 16 A). También contamos y medimos los pelos radiculares de la zona de maduración de la raíz primaria con la ayuda de un microscopio. Se encontró que desde concentraciones de 150 μ M, el crecimiento de los pelos radiculares es inhibido significativamente por la serotonina (Fig. 16 B). El análisis del número de pelos radiculares muestra que la serotonina también inhibe la formación de los pelos radiculares de una manera dependiente de la concentración (Fig. 16 C). El análisis de la línea transgénica *pAtEXP7:uidA* la cual expresa el promotor del gen que codifica para la expansina 7 de *Arabidopsis* fusionado al gen GUS en los tricoblastos y es un marcador de iniciación de pelos radiculares reveló que la serotonina causa un programa deficiente de diferenciación celular en las células epidérmicas de la raíz, evidenciado por la pérdida de la expresión de GUS en los tricoblastos de plantas tratadas con la serotonina (Fig. 16 D).

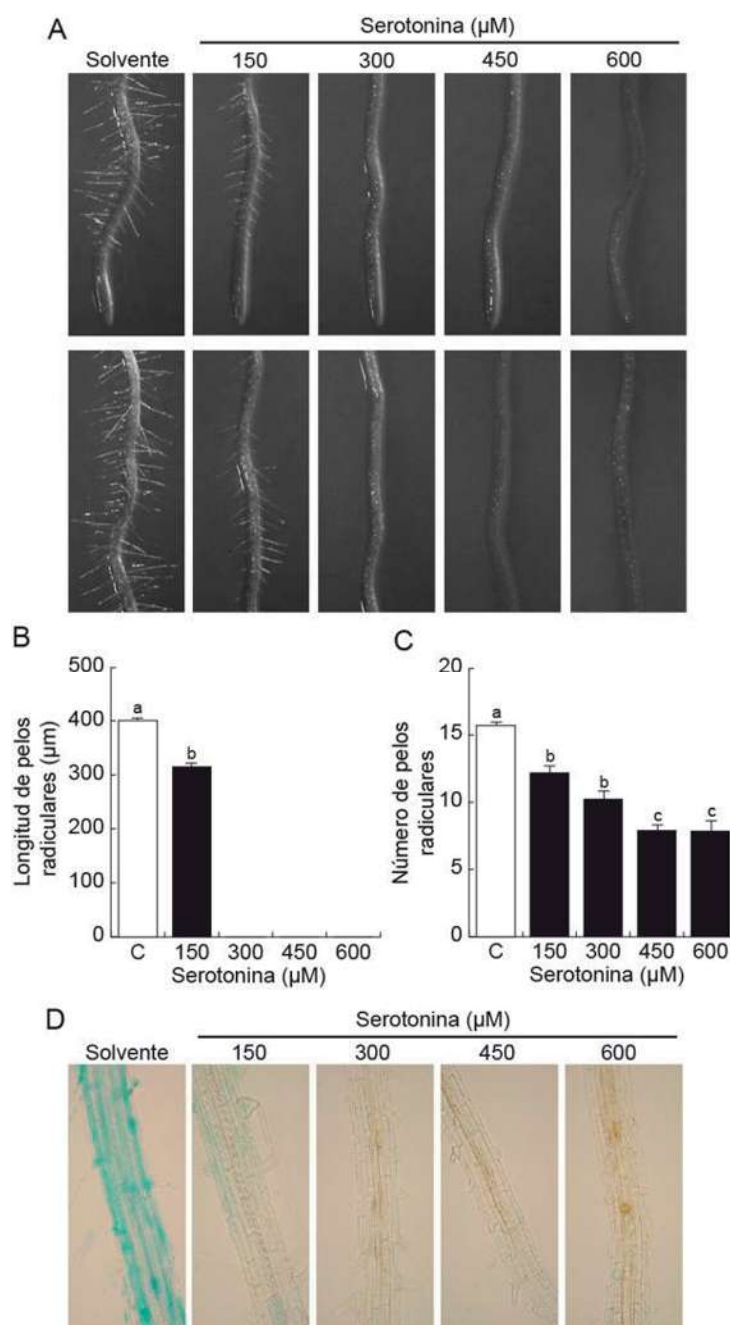


Figura 16. Efecto de la serotonina sobre el desarrollo de los pelos radicales. Las plantas de *Arabidopsis thaliana* se crecieron en medio MS 0.2X suplementado con las concentraciones indicadas de serotonina durante 5 días. (A) fotografías representativas del efecto de la serotonina en el desarrollo de pelos radicales sobre la zona de maduración y diferenciación, (B y C) muestran la media $\pm$ desviación estándar para, (B) la longitud de pelos radicales y (C) número de pelos radicales en 500 μm . (D) expresión de *pAtEXP7:uidA* en respuesta a serotonina. Las distintas letras indican una diferencia estadística con una $P < 0.05$. El experimento fue repetido tres veces con resultados similares.

6.6. Identificación y cuantificación de serotonina por GC-MS en plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Si bien se ha reportado que la serotonina se encuentra presente de manera natural en una amplia variedad de especies de plantas, en diferentes concentraciones dependiendo de la planta, el tejido y las condiciones de crecimiento, hasta entonces se desconocía su presencia en *Arabidopsis thaliana*. Para determinar si este compuesto era producido naturalmente por esta planta y si los efectos observados en la arquitectura del sistema radicular correlacionaban con la acumulación de serotonina en los tejidos vegetales, se realizaron experimentos para la identificación y cuantificación de dicha molécula. Los tejidos analizados fueron la raíz y follaje de plantas silvestres de *Arabidopsis* tratadas con el solvente o con concentraciones crecientes de serotonina, utilizando cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS). En las plantas tratadas únicamente con el solvente, se detectaron cantidades pequeñas de serotonina tanto en la raíz como en el follaje (Fig. 17 A). Sin embargo, los niveles de serotonina en éstos tejidos aumentaron drásticamente cuando fueron tratadas con las concentraciones crecientes serotonina (Fig. 17 A). Para la identificación de la serotonina, las muestras requirieron un proceso de derivatización en el cual la serotonina fue acetilada por el anhídrido acético produciendo N-acetilserotonina (Fig.17 B). Los paneles de la Fig. 17 C y D muestran el espectro de masas de la N-acetilserotonina del estándar y el de una de las muestras de la planta, respectivamente. Los cromatogramas representativos de muestras de raíz y follaje de plantas tratadas con el solvente o con serotonina se muestran en las Fig. 17 E-H. Estos resultados proporcionaron la primera evidencia de que la serotonina es producida naturalmente en *Arabidopsis* y que las plantas son capaces de tomar la serotonina a partir del medio de crecimiento.

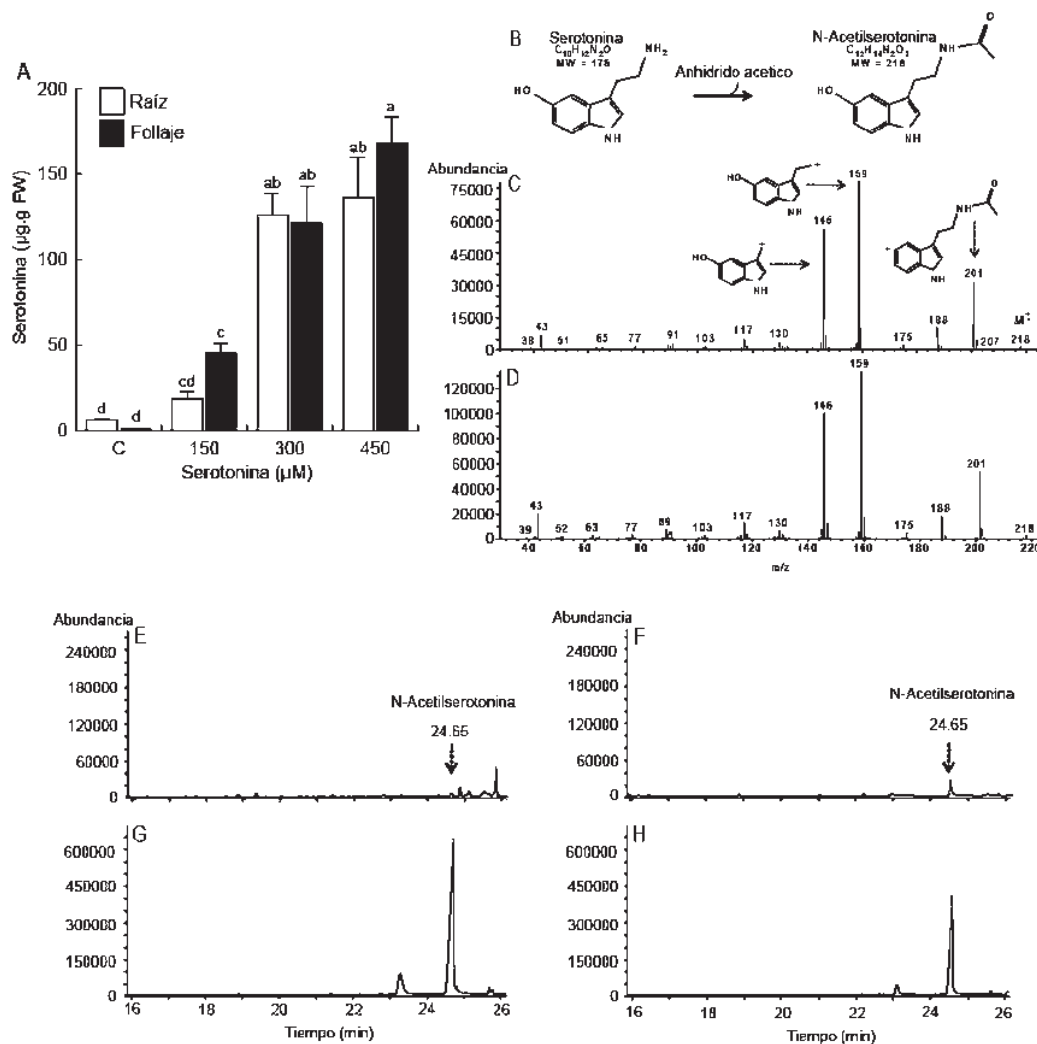


Figura 17. Determinación y cuantificación de la serotonina en plantas de *Arabidopsis* crecidas en presencia o ausencia de serotonina por GC-MS. Las semillas fueron germinadas y crecidas durante 22 días en medio MS 0.2X suplementado o no con las concentraciones de serotonina que se indican. (A) cuantificación de los niveles de serotonina en raíz y follaje, (B) reacción de acetilación de la serotonina con anhídrido acético, (C) espectro de masas del estándar de N-acetilserotonina, y (D) de una muestra de la planta, (E-H) cromatogramas de la N-acetilserotonina apartir de follaje y raíz de plantas tratadas con el solvente (E y F) o de follaje y raíz tratadas con 450 μM de serotonina (G y H), respectivamente. Las distintas letras indican una diferencia estadística con una $P < 0.05$.

6.7. Efecto de la serotonina sobre la expresión de genes inducibles por auxinas.

Para determinar si la serotonina activa la expresión de genes regulados por auxinas y estudiar una posible interacción de la serotonina con la señalización de las auxinas, se evaluó la expresión de los marcadores inducibles por auxinas *DR5:uidA* y *BA3:uidA* en respuesta a la serotonina. Como se mostró previamente, concentraciones bajas de serotonina activan el desarrollo de las raíces laterales por inducir la emergencia de los primordios (Figs. 10 y 14). Por esta razón, se determinó la expresión histoquímica de GUS durante el desarrollo de los primordios de raíces laterales en plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan el marcador *DR5:uidA* en respuesta al solvente o a una de las concentraciones inductoras de serotonina (150 μ M). La serotonina claramente inhibe la expresión del marcador en los primordios de raíces laterales en todas las etapas del desarrollo estudiadas (Fig. 18 A). También se analizó la respuesta de los marcadores *DR5:uidA* y *BA3:uidA* a altas concentraciones de serotonina mediante una tinción histoquímica de las plantas transgénicas que expresan estos marcadores, que fueron crecidas por 7 días en medio MS 0.2X y transferidas a medio líquido suplementado con el solvente, 5 μ M de AIA o 450 μ M de serotonina e incubadas por 9 hrs a 22 °C. Como se reporta en la literatura (Ulmasov *et al.*, 1997b), en plantas *DR5:uidA* tratadas con el solvente, la expresión de GUS fue discreta en los cotiledones y hojas expresándose principalmente en la región de la punta de la raíz (Fig. 18 B). Las plantas crecidas bajo una concentración de 5 μ M de AIA mostraron una fuerte actividad de GUS a través de toda la planta. Por el contrario, el patrón de expresión de GUS en plantas tratadas con 450 μ M de serotonina disminuye en comparación con las plantas tratadas con el solvente, indicando la carencia de actividad auxínica de este compuesto. En el caso de *BA3:uidA* la expresión de GUS en plantas tratadas únicamente con el solvente es indetectable en la raíz y mínimamente en los pecíolos (Fig. 18 C), mientras que cuando son tratadas con 5 μ M de AIA éstas mostraron una fuerte expresión de GUS principalmente en los pecíolos de los cotiledones y en la zona de elongación de la raíz. La expresión de GUS en plantas tratadas con serotonina fue indetectable indicando que este compuesto no activa la expresión de ambos marcadores.

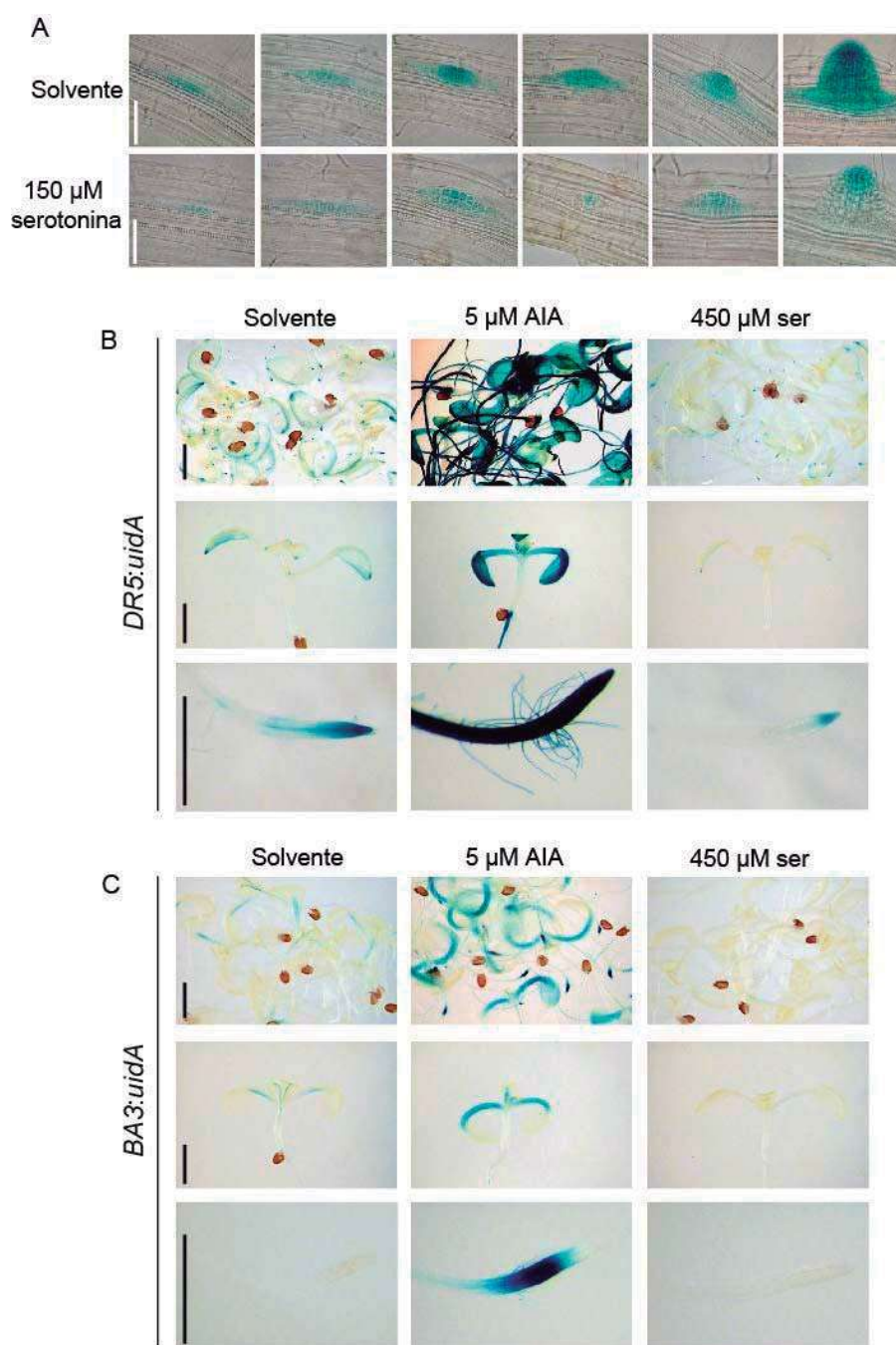


Figura 18. Efecto de la serotonina sobre la expresión de genes regulados por auxinas. Las plantas transgénicas *DR5:uidA* y *BA3:uidA* fueron crecidas por 7 días en medio MS 0.2X y transferidas a medio líquido con AIA o serotonina para evaluar la expresión de GUS. (A) expresión de *DR5:uidA* en los primordios de RL, (B) efecto comparativo de la expresión con AIA y serotonina de *DR5:uidA*, (C) y de *BA3:uidA*. Las fotos individuales son representativas de al menos 20 plantas. Los experimentos fueron realizados dos veces con resultados similares. Barras A = 50 µm, B y C = 500 µm.

Como uno de los procesos regulados por la serotonina fue la formación de raíces adventicias, también analizamos la expresión de *DR5:uidA* en raíces adventicias inducidas a partir de plantas de *Arabidopsis* tratadas con 150 a 600 μ M de serotonina, encontrándose un efecto inhibitor dependiente de la concentración en la expresión de GUS, indicando que la serotonina no estimula sino más bien reprime la expresión de genes inducibles por auxinas (Fig. 19).

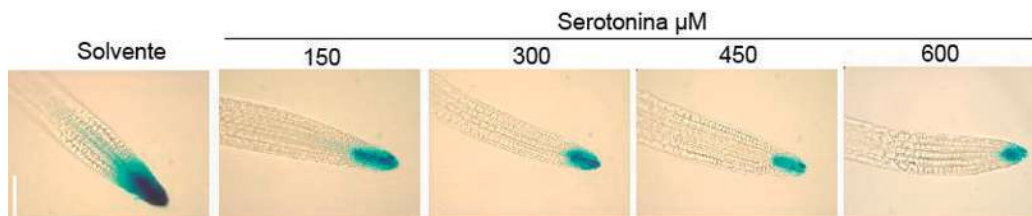


Figura 19. Efecto de la serotonina sobre la expresión de *DR5:uidA* en raíces adventicias a partir de explantes de hipocotilo. Las plantas transgénicas que expresan el marcador *DR5:uidA* fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X durante 5 días en condiciones de oscuridad para la obtención de explantes de tallo. Éstos fueron tratados con las concentraciones crecientes de serotonina y cultivados por 5 días. Las plantas se procesaron para determinar la actividad de β -glucuronidasa y se clarificaron para mostrar la expresión del gen reportero. Las fotos son representativas de al menos 20 plantas por tratamiento. Notar el fuerte efecto inhibitorio de la serotonina sobre la expresión de *DR5:uidA*. El experimento se repitió dos veces con resultados similares. Barra = 100 μ m.

Para elucidar el posible mecanismo de acción de la serotonina, enseguida realizamos ensayos de competencia sobre la expresión de los marcadores inducibles por auxinas *DR5:uidA* y *BA3:uidA*. Plantas de estas líneas transgénicas fueron crecidas por 7 días en medio MS 0.2X, y posteriormente transferidas a medio líquido suplementado con el solvente, 1 μ M de AIA o ANA y 450 μ M de serotonina (concentración representativa de los efectos represores) o cada una de las auxinas en combinación con la serotonina e incubadas durante 9 h a 22° C. Cuando la serotonina y el AIA fueron suplementados en combinación en el medio de inducción fue evidente una disminución en la expresión de ambos marcadores (Fig. 20 A). La serotonina también antagonizó la expresión de *DR5:uidA* y *BA3:uidA* en respuesta a ANA, una auxina sintética (Fig. 20 B). Estos resultados sugieren que la serotonina puede actuar como inhibidor competitivo de la expresión de genes regulados por auxinas y puesto que las auxinas usadas presentan diferentes propiedades de transporte (el AIA utiliza transportadores, mientras que el ANA se transporta por difusión), parece ser que la serotonina no afecta el transporte de auxinas.

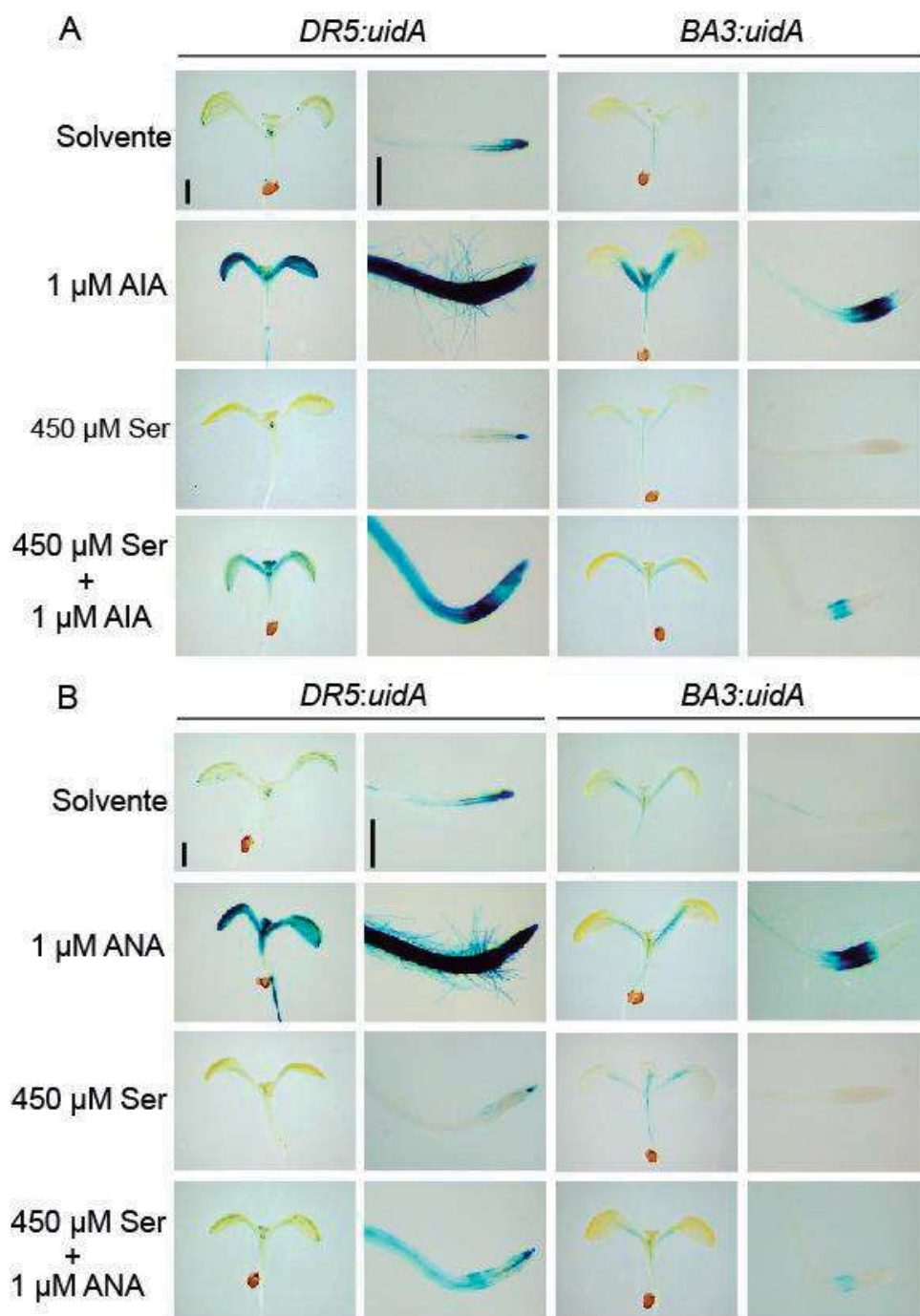


Figura 20. Efecto antagónico de la serotonina sobre la expresión de genes regulados por AIA Y ANA. (A) efecto de la serotonina sobre la expresión inducida por el ácido indol-3-acético (AIA), y (B) ácido naftaleno acético (ANA). Las fotos son representativas de al menos 20 plantas. Los experimentos fueron realizados dos veces con resultados similares. Barras = 250 μ m.

6.8. Efecto de la serotonina sobre la degradación de AXR3/IAA17 mediada por auxinas.

Uno de los principales componentes que regulan la señalización auxínica son las proteínas represoras AUX/IAA, que impiden la activación de los factores transcripcionales ARFs, los cuales inducen la expresión de los genes regulados por auxinas. Esta familia de proteínas represoras se degradan en respuesta al aumento en los niveles de auxinas, a través de la ruta ubiquitina-proteosoma, permitiendo la activación de los ARF's e induciendo así la expresión de genes de respuesta primaria a auxinas (Gray *et al.*, 2001). Para determinar el efecto de la serotonina sobre la degradación de las proteínas AUX/IAA mediada por auxinas, se examinó el efecto del AIA y la serotonina sobre la estabilidad de las proteínas AUX/IAA usando la línea transgénica de Arabidopsis *HS::AXR3NT-GUS*, en la cual una fusión traduccional entre el dominio I y II de AXR3 se expresa bajo el control de un promotor inducible por choque térmico (Gray *et al.*, 2001). Las plantas que expresan dicha construcción fueron inducidas a 37 °C por 2 h y posteriormente tratadas con 5 µM de AIA, 450 µM de serotonina o 5 µM de AIA en combinación con 450 µM de serotonina durante 10, 30 y 60 minutos. La proteína es fuertemente expresada después de la inducción tanto en raíz como en los cotiledones de las plantas y se mantiene fuerte aun después de 60 minutos en las plantas control incubadas únicamente con el solvente (Fig. 21 A-D). Los tratamientos con AIA mostraron una degradación rápida de la proteína de fusión, evidenciado principalmente en cotiledones y la raíz primaria (Fig. 21 E-H). La serotonina no indujo la degradación de esta proteína aún después de 60 minutos de tratamiento (Fig. 21 I-L). Por el contrario, se alcanza a apreciar una estabilización en la expresión del marcador en los cotiledones indicando una actividad antagónica a auxinas. Cuando ambos compuestos fueron suplementados juntos, el efecto del AIA predomina en la estabilidad de la proteína, dando lugar a un patrón de expresión de GUS similar al que se observa en plantas de Arabidopsis tratadas solo con AIA (Fig. 21 M-P), lo que indica que la serotonina actúa independientemente de las auxinas o cascada abajo al receptor de auxinas el cual modula la degradación de la proteína AXR3.

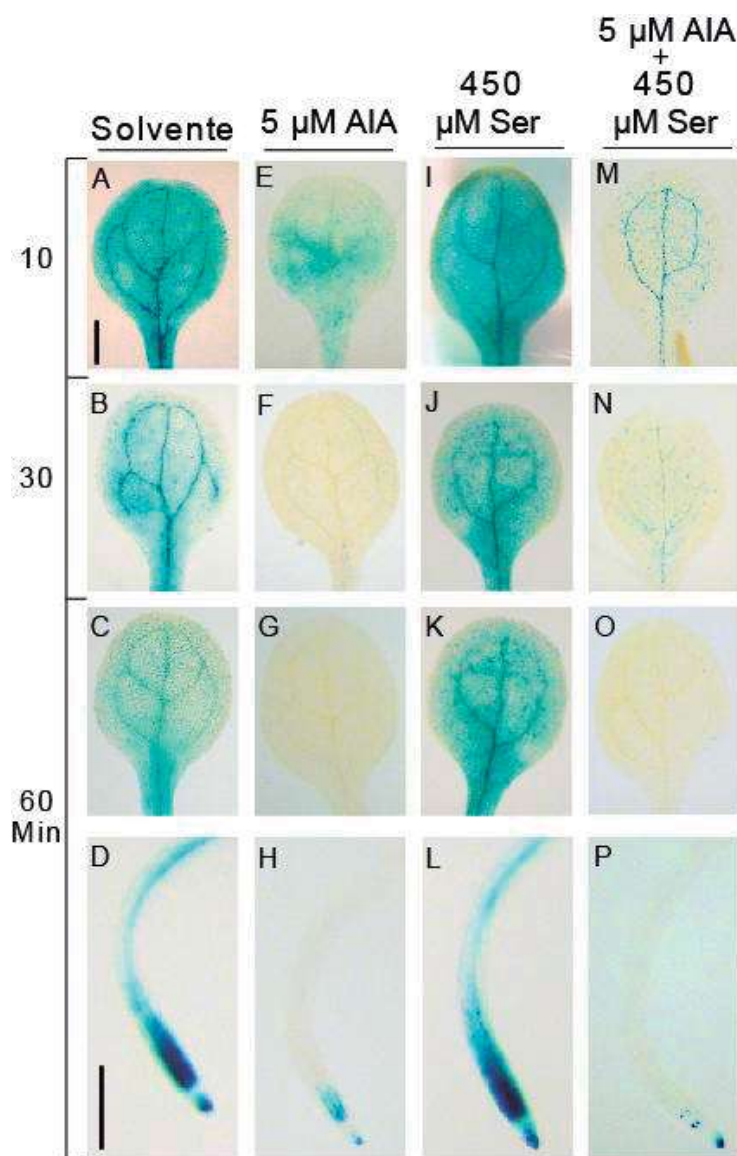


Figura 21. Análisis de la estabilidad de la proteína AXR3/IAA17 utilizando plantas transgénicas que expresan la construcción *HS::AXR3NT-GUS*. Las plantas que expresan la construcción antes mencionada fueron crecidas en medio MS 0.2X durante 7 días e inducidas a 37 °C por 2 horas en medio líquido. Posteriormente a la inducción, las plantas fueron tratadas con el solvente, AIA, serotonina + AIA y serotonina en las concentraciones indicadas durante diferentes periodos de tiempo y procesadas para la expresión de GUS. Las fotos son representativas de al menos 20 plantas por tratamiento. El experimento se realizó dos veces con resultados similares. Barra = 250 μ m.

6.9. Efecto de la serotonina sobre la formación de raíces laterales inducidas por auxinas.

Para esclarecer si los efectos observados de la serotonina sobre la arquitectura de la raíz se deben a su actividad como un inhibidor de auxinas, se investigó el antagonismo de la serotonina sobre la inducción de raíces laterales por ANA, una auxina con alta capacidad para estimular la formación de raíces laterales. A los siete días después de la germinación, se cuantificó el crecimiento de la raíz primaria y el número de raíces laterales. En este experimento, una concentración de 150 μM de serotonina no afecta el crecimiento de la raíz primaria (Fig. 22 A), pero aumenta significativamente el número de raíces laterales (Fig. 22 B). Los tratamientos con el ANA y el ANA suplementado con serotonina mostraron un fuerte efecto promotor de la ramificación de la raíz. Es importante resaltar que la serotonina induce el crecimiento longitudinal de las raíces laterales específicamente cuando se adiciona al medio junto con el ANA indicando que la serotonina restringe los efectos represores de la auxina sobre la elongación celular (Fig. 22 C y D). Por lo contrario, cuando el medio se suplementa con concentraciones de 300 y 450 μM de serotonina se inhibe el crecimiento de la raíz primaria y la formación de las raíces laterales. El tratamiento con 0.1 y 0.2 μM de ANA en el que también se inhibe el crecimiento de la raíz primaria, estimuló fuertemente la formación de raíces laterales. A estas concentraciones la serotonina tiene un efecto antagonista sobre la formación de raíces laterales inducidas por el ANA (Fig. 23). Estos resultados indican que aunque los efectos de la serotonina y el ANA sobre el crecimiento de la raíz primaria son similares inhibiendo su crecimiento, cada uno de ellos actúa de manera opuesta o antagónica en la regulación del desarrollo de las raíces laterales en concentraciones mayores a 150 μM .

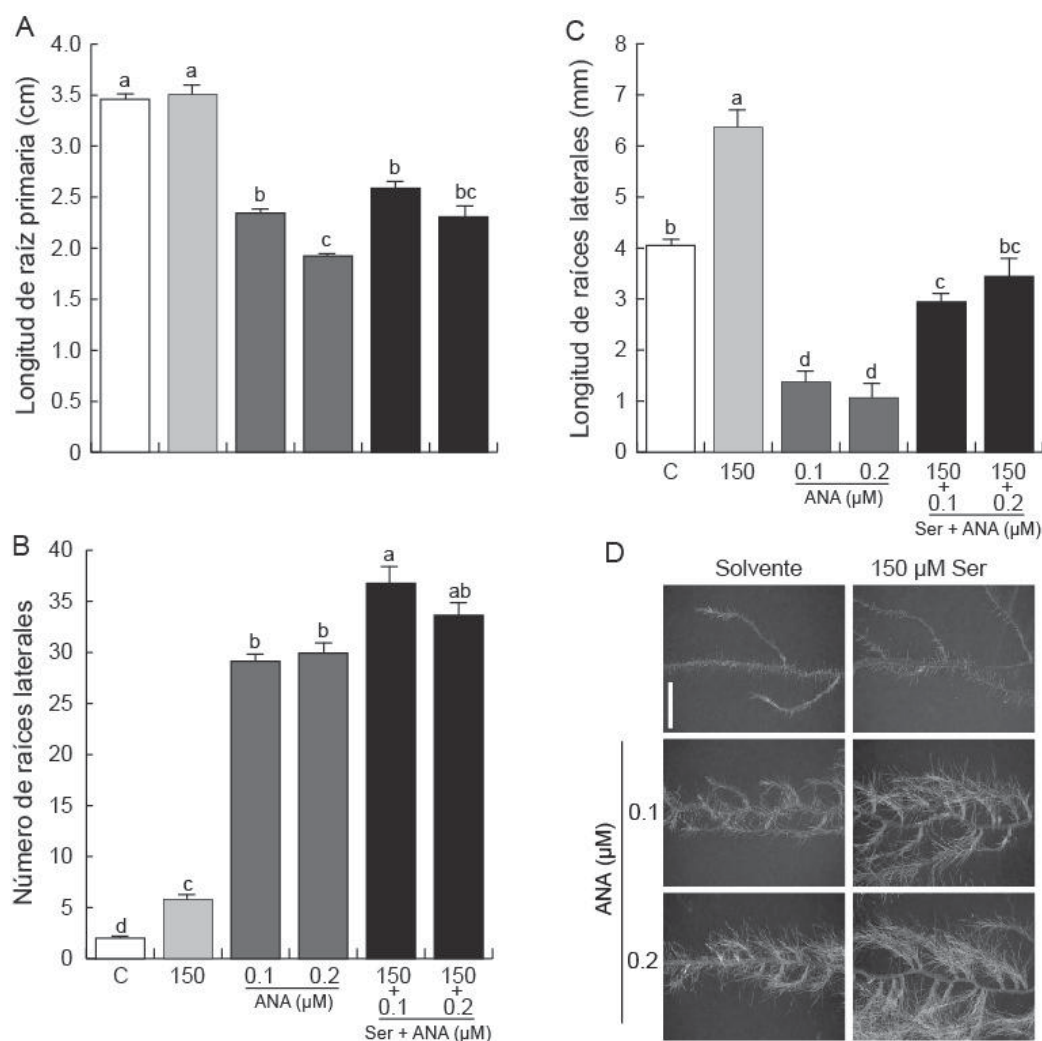


Figura 22. Efecto de la serotonina en combinación con el ANA sobre el desarrollo de las raíces laterales. Las plantas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X suplementado con ANA, serotonina o ambos compuestos en las concentraciones indicadas. Siete días después de la germinación se cuantificaron las sig. variables: (A) crecimiento de la raíz primaria, (B) número de raíces laterales, (C) longitud de raíces laterales, (D) fotografías representativas de plantas crecidas en los diferentes tratamientos. Los valores mostrados representan la media $\pm$ desviación estándar ($n=20$ plantas por tratamiento). Las distintas letras indican una diferencia estadística con una $P < 0.05$. El experimento fue repetido tres veces con resultados similares. Barra D = 1 mm.

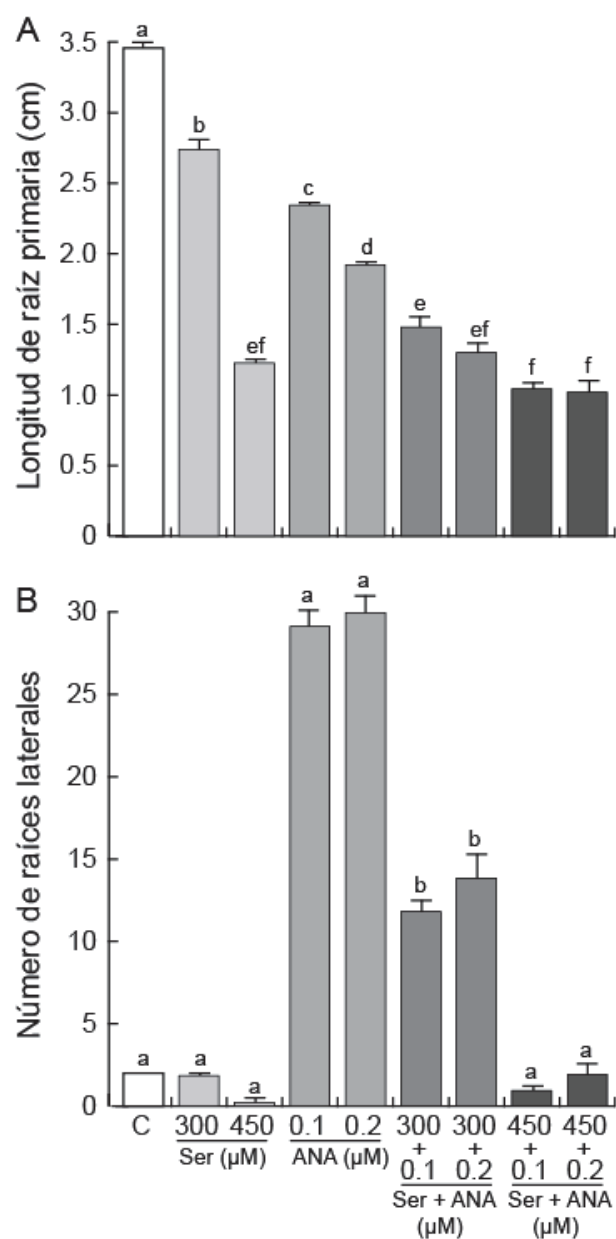


Figura 23. Efecto antagónico de la serotonina sobre la formación de raíces laterales inducida por ANA. Las plantas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X, suplementado con ANA, serotonina o ambos compuestos en las concentraciones indicadas. Siete días después de la germinación se cuantificó (A) crecimiento de la raíz primaria, y (B) número de raíces laterales. Los valores mostrados representan la media $\pm$ desviación estándar ($n=20$ plantas por tratamiento). Las distintas letras indican una diferencia estadística con una $P < 0.05$. El experimento fue repetido tres veces con resultados similares.

6.10. Efecto de la serotonina sobre la arquitectura de la raíz en mutantes de *Arabidopsis* afectadas en la respuesta a auxinas.

Para evaluar el papel que juegan distintos genes que median la respuesta a auxinas en las respuestas a serotonina, se comparó el crecimiento de la raíz primaria y la formación de raíces laterales de plantas silvestres (Col-0), en las mutantes de *Arabidopsis* *axr2-1*, *axr1-3*, *axr4-1* y *aux1-7*, afectadas en la señalización de los factores de transcripción, o en el transportador de auxinas en medio suplementado con 150 μ M de serotonina. La serotonina aumentó el número y la densidad de raíces laterales en las plantas silvestres y en las mutantes, *axr4-1* y *aux1-7*, pero no en las mutantes *axr1-3* y en *axr2-1* (Fig. 24 A-C). Sin embargo en la mutante *axr2-1*, se evidenció una mayor formación de raíces laterales aun cuando se crecen en medio sin serotonina, lo cual podría explicar la ausencia de efecto de la serotonina en la inducción de raíces laterales, ya que como se observamos la serotonina promueve la emergencia de primordios preexistentes y no la formación de nuevos primordios (Fig. 24 B y C).

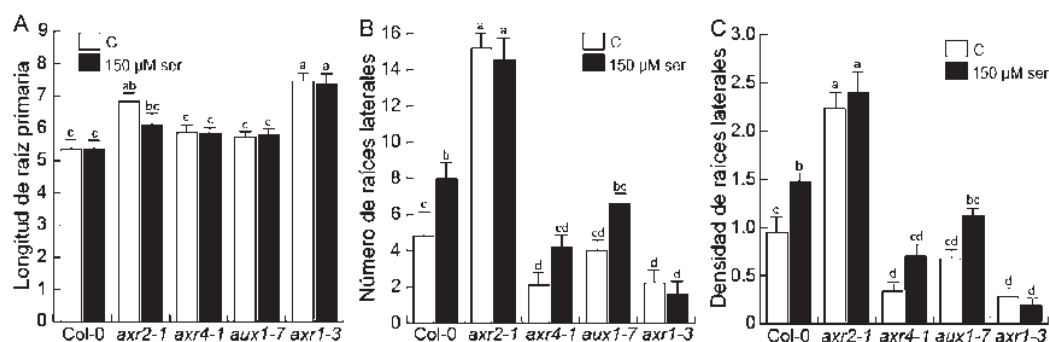


Figura 24. Efecto de la serotonina sobre la formación de raíces laterales en plantas silvestres y en mutantes relacionadas a auxinas. Las semillas de plantas silvestres (Col-0) y mutantes de *Arabidopsis thaliana* fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X sólido, suplementado con 150 μ M de serotonina. Doce días después de la germinación se cuantificó (A) crecimiento de la raíz primaria, (B) número de raíces laterales, (C) densidad de raíces laterales. Los valores mostrados representan la media $\pm$ desviación estándar (n=30 plantas por tratamiento). Las distintas letras indican diferencias estadísticas con una $P < 0.05$. El experimento fue repetido tres veces con resultados similares.

También se determinó el efecto de 450 μ M de serotonina sobre las mutantes de auxinas. En esta concentración ocurrió una inhibición del crecimiento de la raíz primaria del 80% en plantas silvestres y en las cuatro mutantes analizadas (Fig. 25 A). Las plantas silvestres como las mutantes antes mencionadas cuando son crecidas en medio sin serotonina en su

mayoría presentan ausencia de raíces adventicias mientras que cuando son crecidas en medio con 450 de serotonina se encontró la formación de 3 a 6 raíces adventicias por planta. Este efecto fue similar en plantas silvestres y en las mutantes *axr4-1* y en *aux1-7*, sin embargo, en la mutante *axr2-1* el efecto encontrado es mayor mientras que en *axr1-3* hubo menor formación de raíces adventicias (Fig. 25 B). En otro experimento diseñado para determinar la sensibilidad de estas mutantes a auxinas se analizó el efecto del AIA en el crecimiento de la raíz primaria y en la formación de raíces adventicias, la resistencia normal en el crecimiento de la raíz fue evidente en las cuatro mutantes (Fig. 25 C), así como en la inducción de raíces adventicias excepto en *axr1-3* la cual presentó una menor formación de raíces adventicias (Fig. 25 D). En conjunto, los resultados antes mencionados indican que la inducción de raíces laterales y adventicias por la serotonina es independiente de *axr2-1*, *axr4-1* y *aux1-7* pero requiere de *axr1-3*.

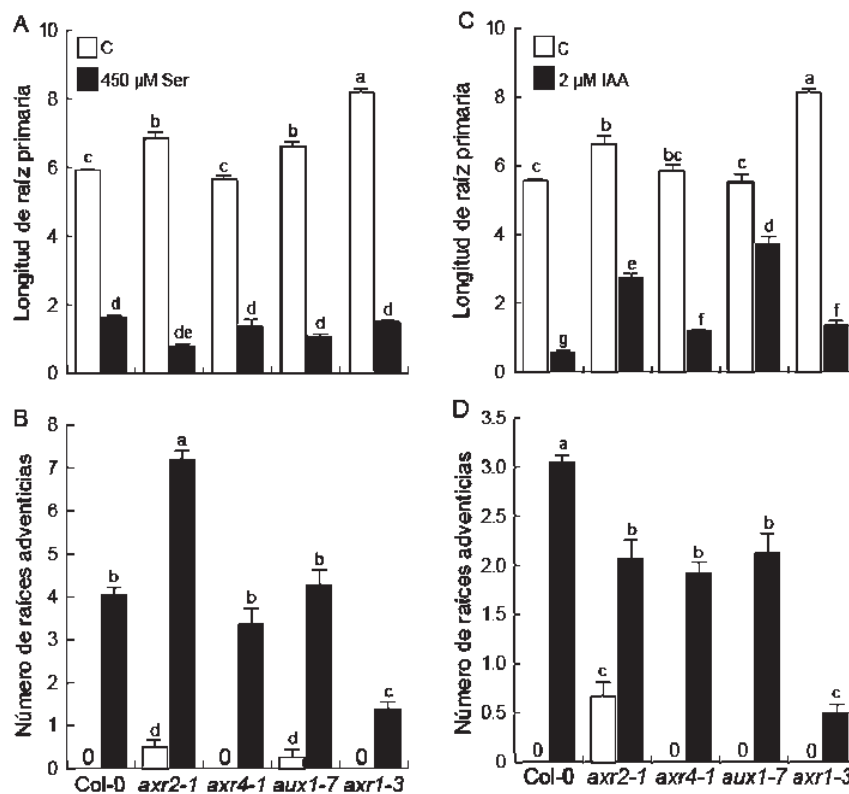


Figura 25. Análisis comparativo del efecto de la serotonina y del AIA en mutantes afectadas en la respuesta a auxinas. Las diferentes mutantes fueron crecidas lado a lado con plantas silvestres en cada una de las condiciones indicadas. Efecto de la serotonina sobre el crecimiento de la raíz primaria (A), la formación de raíces adventicias (B), efecto del AIA sobre el crecimiento de la raíz primaria (C), y la formación de raíces adventicias (D).

6.11. Efecto de la serotonina sobre la viabilidad celular.

Como pudimos observar en los diferentes experimentos realizados en este trabajo, la serotonina ejerce efectos represores sobre el desarrollo en concentraciones altas, por lo que era posible que algunos de los efectos observados pudieran deberse a la toxicidad del compuesto comprometiendo la viabilidad celular en la planta. Para determinar el efecto de la serotonina sobre la viabilidad celular de la raíz, se estudió la expresión génica en la línea transgénica de *Arabidopsis AtH2B:YFP*, es un marcador de viabilidad celular expresado en los núcleos de las células intactas mediante microscopia confocal. En plantas tratadas con concentraciones crecientes de serotonina y teñidas con yoduro de propidio (IP), un fluorocromo que se difunde libremente a través de células muertas o dañadas, el análisis nos permitió visualizar la presencia del marcador en los núcleos de las células de la zona meristemática aún en las plantas tratadas con 600 μM de serotonina (Fig. 26), indicando que el meristemo de la raíz se encontraba viable, además de que el IP fue incapaz de penetrar a la célula (Fig. 26). Estos resultados sugieren que la serotonina regula el desarrollo de la raíz sin comprometer la viabilidad celular.

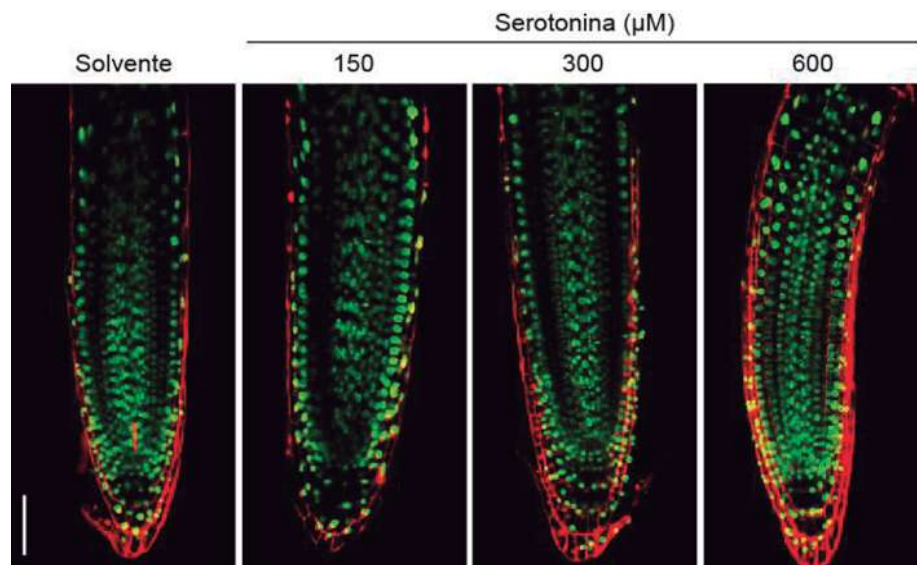


Figura 26. Efecto de la serotonina sobre la viabilidad celular del meristemo de la raíz. Plantas transgénicas que expresan el marcador *AtH2B:YFP* fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X suplementado con diferentes concentraciones de serotonina. A los siete días después de la germinación, las plantas se trataron con IP y se analizaron por microscopia confocal para determinar la estructura y la viabilidad celular. Barra = 50 μm .

7. DISCUSIÓN.

La serotonina es un compuesto derivado del triptófano que se encuentra presente en los animales y en las plantas. Como resultado de las investigaciones realizadas sobre la presencia de la serotonina en las plantas se pueden destacar tres aspectos importante: 1) que es un compuesto ubicuo, presente en muchas especies de diferentes familias, 2) que al igual que el AIA es producido a partir del triptófano, y 3) que su concentración puede variar en los diferentes tejidos o en respuesta a factores biótico y abióticos, sugiriendo que la serotonina puede tener funciones fisiológicas y adaptativas importantes (Ishihara *et al.* 2008, Kang *et al.* 2009a). Sin embargo, hasta la fecha se conoce poco acerca de los mecanismos de señalización de este compuesto en las plantas. En un trabajo realizado por Kang *et al.*, (2009a) con plantas de arroz (*Oriza sativa*) se sugiere que la serotonina está involucrada en el retardamiento de la senescencia posiblemente por una función como antioxidante que mantiene la integridad celular en los tejidos senescentes, ya que existe una mayor acumulación de serotonina en las hojas de esta planta crecida en condiciones nutrimentales deficientes que promueven la senescencia, y que esta acumulación coincide con la inducción transcripcional de los genes involucrados en la síntesis de serotonina como la TDC. Las plantas que sobreexpresan este gen (*TDC*), produjeron una mayor cantidad de serotonina que coincidía con una senescencia retardada, contrario a lo que ocurre en líneas donde la expresión del gen *TDC* es suprimida a través de un sistema de RNA de interferencia (RNAi), las cuáles presentan menor contenido de serotonina en las hojas y éstas envejecen más rápido que las plantas silvestres.

Puesto que la participación de la serotonina en el desarrollo de las plantas no está bien entendida, en este trabajo se investigó el efecto de la serotonina en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. La hipótesis de trabajo proponía que este compuesto podría actuar como un regulador del crecimiento de manera semejante a la auxina o interfiriendo con la acción de las auxinas. Una de las herramientas que han permitido abundar en nuestro entendimiento de la señalización de las auxinas ha sido el uso de inhibidores de la respuesta auxínica, estos inhibidores se han dividido en dos clases principales: los que alteran el transporte de auxinas y los que alteran la señalización de auxinas. En diversos estudios se han empleado este tipo de inhibidores, de los cuales en la mayoría de los casos son de

origen sintético como el ácido naftiltalámico (NPA), el ácido clorofenoxiisobutírico (PCIB) y el ácido triyodobenzoico (TIBA), o pequeñas moléculas sintéticas a que tienen como estructura molde las auxinas pero con diversas sustituciones, que pueden interactuar con el receptor de auxinas TIR1 bloqueando la unión del AIA activo (Fujita y Syono 1996, Casimiro *et al.* 2001, Oono *et al.* 2003, Hayashi *et al.* 2008). Si bien este tipo de inhibidores han proporcionado información importante acerca del mecanismo molecular de acción de las auxinas, su función en la planta es cuestionable debido a su naturaleza sintética. Más recientemente se ha encontrado que los conjugados del AIA y de AJ con triptófano, los cuales están presentes en las plantas, pueden interferir con un amplio rango de procesos regulados por las auxinas (Staswick, 2009). Los resultados del presente trabajo muestran que la serotonina puede actuar también como un inhibidor endógeno de las respuestas inducidas por auxinas en las plantas. En este estudio usamos el sistema radicular de *Arabidopsis* para investigar el efecto de la aplicación exógena de serotonina sobre diversos procesos morfogénéticos, como el crecimiento de la raíz primaria, la formación de raíces laterales y adventicias, así como el desarrollo de los pelos radiculares, procesos regulados por auxinas. Encontramos que la serotonina en concentraciones de 10 a 160 μ M presenta un efecto promotor sobre el desarrollo de las raíces laterales al inducir la maduración de los PRL (Figs. 10 y 14). Este efecto coincide con una disminución en la expresión del marcador *DR5:uidA* en los primordios de las raíces laterales. Sin embargo, en concentraciones mayores de serotonina reprimen la formación de raíces laterales y el desarrollo de los pelos radiculares, pero aumenta la formación de raíces adventicias en plantas germinadas directamente sobre el medio de crecimiento y en explantes de tallo cultivados bajo tratamientos de serotonina (Figs. 11, 12 y 15).

La actividad de la serotonina en la modulación del crecimiento de la raíz fue menor que lo observado para auxinas, ya que como se aprecia en la Fig. 11, la serotonina solo inhibe ligeramente el crecimiento de la raíz en concentraciones bajas y en 300 μ M esta inhibición es menor del 50% comparado con el control. En comparación, bajo las mismas condiciones de crecimiento y usando el mismo medio de crecimiento, el AIA o el ANA producen un 50 % de inhibición en concentraciones de al menos dos órdenes de magnitud menor que la serotonina. El análisis de la literatura nos revela que al igual que la serotonina, el glutamato otro neurotransmisor de animales presente en plantas, aplicado en concentraciones

superiores a 500 μ M muestra inhibición en el crecimiento de la raíz de un 60 % en plantas silvestres de *Arabidopsis* (Col-0) (Walch-Liu *et al.*, 2006). La serotonina como el glutamato no interfieren con la iniciación de raíces laterales, al contrario, ambas moléculas estimulan la emergencia de las raíces laterales a través de la maduración de los primordios. Sin embargo una diferencia importante entre el mecanismo de acción de la serotonina comparado con el glutamato es el papel de la señalización de auxinas en respuesta a estas señales. Las mutantes *axr1-3* y *axr1-12* con pérdida de función en el gen *AXR1* fueron hipersensibles al glutamato en el crecimiento de la raíz primaria mientras que la mutante *aux1-7* fue resistente, indicando que el transporte y la señalización de auxinas pueden ser importantes para las respuestas de la raíz al glutamato (Walch-Liu *et al.*, 2006). En cambio, el crecimiento de la raíz primaria fue inhibido, tanto en plantas silvestres como en las mutantes *aux1-7*, *axr1-3* cuando fueron tratadas con 450 μ M de serotonina, lo que sugiere que la respuesta de la serotonina sobre el crecimiento de la raíz primaria no requieren de *AXR1* ni de *AUX1* (Fig. 25 A). Los efectos de concentraciones altas de serotonina sobre la inhibición del crecimiento de la raíz primaria y sobre la represión en la formación de raíces laterales son similares a aquellos causados por inhibidores del transporte de auxinas tales como TIBA y NPA (Fujita y Syono, 1996; Casimiro *et al.*, 2001). Los efectos de la serotonina también son parecidos a los causados por la aplicación del yoconolido B, un inhibidor de la acción de las auxinas aislado de *Streptomyces diastatochromogenes*, el cual estimula la formación de raíces laterales en concentraciones bajas y en altas promueve el desarrollo de raíces adventicias (Hayashi *et al.*, 2003). Un aporte de nuestro trabajo fue encontrar que la serotonina se encuentra en concentraciones bajas tanto en la raíz como en el follaje de plantas de *Arabidopsis*, en tanto que sus niveles aumentan con la aplicación del compuesto al medio de cultivo (Fig. 17). Esto indica la capacidad de esta planta para tomar la serotonina del medio y transportarla hacia los diferentes tejidos.

Las auxinas son importantes en la modulación de la arquitectura de la raíz, así como de una gran cantidad de otros procesos del desarrollo de las plantas. Para establecer si la serotonina puede actuar sobre la señalización o el transporte de auxinas, examinamos su efecto sobre la expresión de los marcadores *DR5:uidA* y *BA3:uidA* los cuales son inducibles por auxinas. Las dos auxinas evaluadas en nuestros experimentos poseen propiedades diferentes de transporte, ya que el AIA es un sustrato para los transportadores de flujo de

auxinas a la célula, mientras que el ANA se difunde libremente a través de las membranas (Delbarre *et al.*, 1996, Marchant *et al.*, 1999). En los experimentos de competencia realizados, encontramos que la serotonina muestra un efecto antagónico similar sobre la expresión de ambos marcadores en respuesta a AIA y ANA (Fig. 18), lo que sugiere que esta molécula no altera el transporte de auxinas.

Otro de los procesos regulados por auxinas es la degradación de la familia de proteínas represoras conocidas como AUX/IAA, por esta razón resultó interesante determinar si la serotonina podría bloquear la degradación de estas proteínas, explicando así los efectos represores sobre la expresión de los marcadores de respuesta a auxinas *DR5:uidA* y *BA3:uidA*. Para probar esta posibilidad, se analizaron los efectos de la serotonina sobre la degradación de una de estas proteínas utilizando la línea transgénica de *Arabidopsis HS::AXR3NT-GUS* la cual expresa fuertemente la proteína de fusión traduccional IAA17/AXR3 bajo control de un promotor inducible por choque térmico (Gray *et al.*, 2001). La degradación de esta proteína es rápida y se incrementó en respuesta a AIA (Fig. 19). Contrario a esto, la serotonina no indujo la degradación de la proteína, indicando una actividad auxínica nula del compuesto. Cuando el AIA y la serotonina se suministraron en combinación, se observó una degradación de la proteína similar a la inducida por la auxina sola (Fig. 21). En conjunto, estos datos sugieren que la serotonina no compite por la unión de la auxina a su receptor o que la serotonina actúa cascada abajo al receptor de auxinas, ya que este modula la degradación de la proteína AXR3. En otro experimento el efecto represor de las auxinas sobre el crecimiento de la raíz primaria no fue suprimido por la serotonina (Fig. 23 A). Sin embargo, la serotonina estimuló el crecimiento de las raíces laterales en la ausencia de auxinas exógenas y exacerbó el efecto del ANA induciendo el crecimiento de las raíces laterales (Fig. 22 C y D), mientras que altas concentraciones de serotonina (450 μ M) bloquearon la formación de raíces laterales en respuesta a la aplicación exógena de auxinas (Fig. 23 B). El efecto de los inhibidores de la respuesta a auxinas sobre la arquitectura de la raíz es variado. Por ejemplo, la terfestatina A promueve el crecimiento de la raíz primaria, efecto que se atribuye a la inhibición de las auxinas endógenas de la planta (Yamazoe *et al.*, 2005, Hayashi *et al.*, 2008). En contraste, el PCIB y yokonolido B suprimen el crecimiento de la raíz primaria sin afectar la viabilidad celular, efecto que es dependiente de TIR1 y AUX/IAA7 (Oono *et al.*, 2003, Hayashi *et al.*, 2003).

Se han reportado varias mutantes de *Arabidopsis* con resistencia a auxinas incluyendo *axr1* y *aux1-7*, las cuales están alteradas en la señalización y el transporte de auxinas respectivamente y muestran una formación reducida de raíces laterales y de pelos radiculares. El hallazgo que las plantas silvestres de *Arabidopsis* (Col-0) tratadas con serotonina presentan pelos radiculares de menor tamaño sugiere que este compuesto interfiere con las respuestas celulares a auxinas. Para determinar si las mutantes con resistencia a auxinas presentan también resistencia a serotonina, evaluamos el efecto de este compuesto sobre la formación de raíces laterales, el crecimiento de la raíz primaria y la formación de raíces adventicias en plantas silvestres y en las mutantes *axr2-1*, *axr4-1*, *aux1-7* y *axr1-3* las cuales son resistentes a auxinas. Se encontró que el tratamiento con 150 μ M de serotonina aumenta significativamente el número y la densidad de raíces laterales en tanto las plantas silvestres como en las mutantes *aux1-7* y *axr4-1* pero no en *axr1-3* y *axr2-1* (Fig. 24 B y C). Sorpresivamente, la mutante dominante *axr2-1* con ganancia de función en la proteína represora AXR2/IAA7, mostró una formación incrementada de raíces laterales aún en ausencia de serotonina, lo que sugiere que AXR2/IAA7 juega un papel positivo en el desarrollo de raíces laterales de acuerdo con información previamente publicada (Nagpal *et al.*, 2000). La respuesta nula de la mutante *axr1-3* a la serotonina indica que este compuesto requiere de la proteína AXR1 para activar el desarrollo de raíces laterales. El tratamiento con una alta concentración de serotonina causó también un mayor desarrollo de raíces adventicias en la mutante *axr2-1* mientras que en la mutante *axr1-3* esta respuesta fue menor comparada con el control (Fig. 25 B).

Aunque el mecanismo de acción de la serotonina no es del todo claro, la evidencia recabada indica que este compuesto puede actuar como un inhibidor natural de auxinas: 1) la serotonina es un compuesto que se encuentra presente en *Arabidopsis* en pequeñas concentraciones. 2) la serotonina estimula la maduración de los primordios de raíces laterales al disminuir la respuesta a auxinas. 3) la aplicación exógena de serotonina inhibe la formación de pelos radiculares, los cuales están bajo control de auxinas. 4) la serotonina bloquea la expresión de los marcadores *DR5:uidA* y *BA3:uidA*, ambos regulados por auxinas, así como la formación de raíces laterales y 5) el análisis del crecimiento de las mutantes indica que la serotonina inhibe el crecimiento de la raíz primaria e induce la formación de raíces adventicias de manera independiente de al menos tres locus

relacionados con la vía auxínica *axr2-1*, *axr4-1* y *aux1-7*. Nuestros resultados proporcionan información novedosa e importante sobre el papel de la serotonina en el desarrollo de las plantas. Además de la serotonina, existen otros reguladores en animales como la melatonina, la acetilcolina, el glutamato, la adrenalina y la dopamina que se encuentran también presentes en las plantas. Las posibles funciones que tienen estas sustancias en el reino vegetal pueden ser esclarecidas mediante el uso de las herramientas moleculares disponibles en *Arabidopsis thaliana* y otras plantas modelo en investigación, como las que fueron utilizadas en nuestro trabajo.

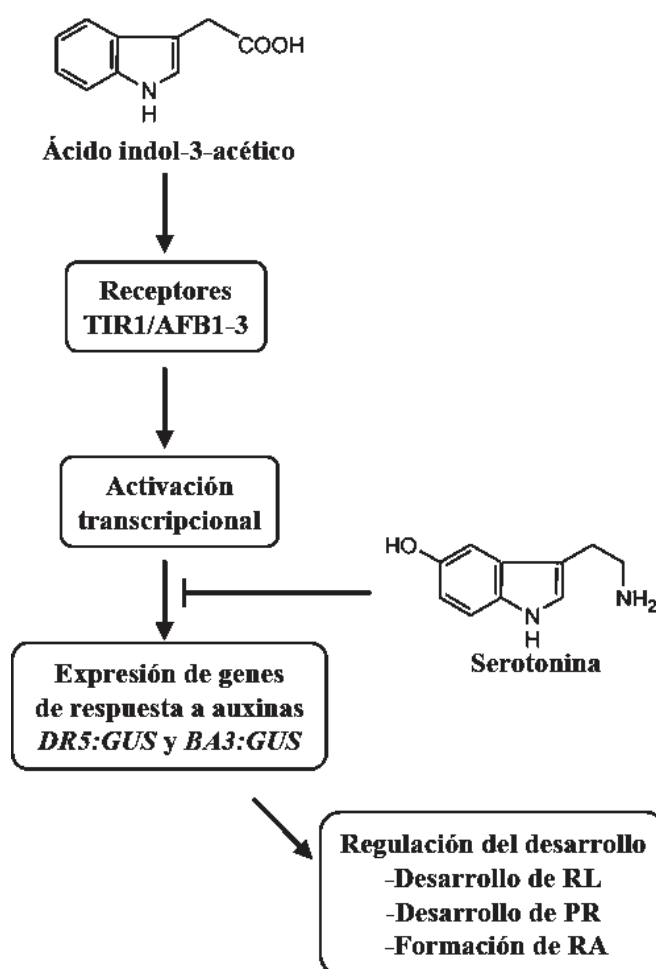


Figura 27. Modelo propuesto de la acción de la serotonina sobre la regulación de la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Los resultados de este trabajo sugieren que la serotonina podría estar regulando la arquitectura de la raíz por interferir con la señalización de auxinas, inhibiendo la expresión de los genes regulados por las auxinas.

8. CONCLUSIONES.

Nuestras investigaciones permiten enlistar las conclusiones siguientes:

- 1) La serotonina regula la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*, afectando diferentes procesos de manera dependiente de la concentración sin comprometer la viabilidad celular.
- 2) El efecto promotor de la ramificación de la raíz en los tratamientos con serotonina, ocurre por un aumento en la maduración de los primordios de las raíces laterales, posiblemente por disminuir la respuesta a auxinas.
- 3) La serotonina se encuentra presente de manera natural en plantas de *Arabidopsis* y estas tienen la capacidad de tomar la serotonina del medio de cultivo por la raíz y transportarla al resto de la planta.
- 4) La serotonina inhibe la expresión de los genes regulados por auxinas y algunos de los procesos del desarrollo regulados por auxinas como la formación de raíces laterales y de los pelos radiculares.
- 5) La susceptibilidad de las mutantes de auxinas a la serotonina en el crecimiento de la raíz primaria sugieren que al menos este efecto es independiente de los genes AXR2, AXR4 y AUX1.

9. REFERENCIAS.

- Abel S., Oeller P.W., Theologis A.** (1994). Early auxin-induced genes encode short-lived nuclear proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 326–330.
- Abel S., Theologis A.** (1996). Early genes and auxin action. *Plant Physiol.* 111: 9-17.
- Anai T., Kono N., Kosemura S., Yamamura S., Hasegawa K.** (1998). Isolation and characterization of an auxin-inducible SAUR gene from radish. *DNA Seq.* 9: 329–333.
- Assmann S.M.** (2002). Heterotrimeric and unconventional GTP binding proteins in plant cell signaling. *Plant Cell* 14: 355-373.
- Ballas N., Wong L.M., Theologis A.** (1993) Identification of the auxin-responsive element, AuxRE, in the primary indoleacetic acid-inducible gene, *PS-IAA4/5*, of pea (*Pisum sativum*). *J. Mol. Biol.* 233: 580-596.
- Benjamins R., Scheres B.** (2008). Auxin: The Looping Star in Plant Development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 443–65.
- Benková E., Michniewicz M., Sauer M., Teichmann T., Seifertová D., Jürgens G., Friml J.** (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115: 591-602.
- Bennetzen J.L.** (2001). "Arabidopsis arrives". *Nat. gene.* 27: 3-5.
- Berger M., Gray J.A., Roth B.L.** (2009). "The expanded biology of serotonin". *Annu. Rev. Med.* 60: 355–66.
- Boisnard-Lorig C., Colon-Carmona A., Bauch, M., Hodge S., Doerner P., Bancharel E., Dumas C., Haseloff J., Berger F.** (2001). Dynamic analyses of the expression of the *HISTONE::YFP* fusion protein in Arabidopsis show that syncytial endosperm is divided in mitotic domains. *Plant Cell* 13: 495–509.
- Bowden K., Brown B.G., Batty J.E.** (1954). 5-Hydroxytryptamine: its occurrence in cowhage. *Nature* 174: 925–926.
- Bubar M.J., Cunningham K.A.** (2006). Serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors as potential targets for modulation of psychostimulant use and dependence. *Curr. Top. Med. Chem.* 6(18): 1971-85.
- Callis J., Vierstra R.D.** (2000). Protein degradation in signaling. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 3: 381–386.
- Campos-Cuevas J.C., Pelagio-Flores R., Raya-González J., Méndez-Bravo A., Ortiz-Castro R., López-Bucio J.** (2008). Tissue culture of *Arabidopsis thaliana* explants reveals a stimulatory effect of alkamides on adventitious root formation and nitric oxide accumulation. *Plant Sci.* 174: 165–173.
- Casimiro I., Marchant A., Bhalerao R.P., Beeckman T., Dhooge S., Swarup R., Graham N., Inzé D., Sandberg G., Casero P.J., Bennett M.** (2001). Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. *Plant Cell Physiol.* 13: 843-852.
- Casimiro I., Beeckman T., Graham N., Bhalerao R., Zhang H., Casero P., Sandberg, Bennett M.J.** (2003). Dissecting Arabidopsis lateral root development. *Trends Plant Sci.* 8: 165-171.
- Chen J.G., Ullah H., Young J.C., Sussman M.R., Jones A.M.** (2001). ABP1 is required for organized cell elongation and division in Arabidopsis embryogenesis. *Genes Dev.* 15: 902-911.
- Cho H.T., Cosgrove D.J.** (2002). Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell* 14:3237-3253.
- Colón-Carmona A., You R., Haimovitch-Gal T., Doerner P.** (1999). Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J.* 20: 503-508.
- Contreras-Cornejo H.A., Macías-Rodríguez L., Cortés-Penagos C., López-Bucio J.** (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 149:1579-1592.
- Csaba G., Pal K.** (1982). Effect of insulin triiodothyronine and serotonin on plant seed development. *Protoplasma* 110: 20–22.

- del Pozo J.C., Dharmasiri S., Hellman H., Walker L., Gray W., Estelle M.** (2002). *AXR1-ECR1*-dependent conjugation of RUB1 to the Arabidopsis cullin AtCUL1 is required for auxin response. *Plant Cell* 14: 421-433.
- Delbarre A., Muller P., Imhoff V., Guerm J.** (1996). Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid, naphthalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta* 198: 532-541.
- Delker C., Raschke A., Quint M.** (2008). Auxin dynamics: the dazzling complexity of a small molecule's message. *Planta* 227: 929-941.
- Dharmasiri N., Dharmasiri S., Estelle M.** (2005a). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 441-445.
- Dharmasiri N., Dharmasiri S., Weijers D., Lechner E., Yamada M., Hobbie L., Ehrismann J., Jürgens G., Estelle M.** (2005b). Plant Development Is Regulated by a Family of Auxin Receptor F-Box Proteins. *Development Cell* 9: 109-119.
- Dharmasiri N., Dharmasiri S., Jones A. M., Estelle M.** (2003). Auxin action in a cell-free system. *Curr. Biol.* 13: 1418-1422.
- Dharmasiri S., Swarup R., Mockaitis K., Dharmasiri N., Singh S.K., Kowalchuk M., Marchant A., Mills S., Sandberg G., Bennett M.J., Estelle M.** (2006). *AXR4* Is Required for Localization of the Auxin Influx Facilitator *AUX1*. *Science* 312: 1218-1220.
- Dharmasiri S., Estelle M.** (2002). The role of regulated protein degradation in auxin response. *Plant Mol. Biol.* 49: 401-409.
- Dinenny J. R., Benfey P. N.** (2009). Studing root development using a genomic aproach. *Ann. Plant Rev.* 37: 325-351.
- Dolan L., Janmaat K., Willemsen V., Linstead P., Poethig J., Roberts K., Scheres B.** (1993). Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119:71-84.
- Dolan L., Duckett C.M., Grierson C., Linstead P., Schneider K., Lawson E., Dean C., Poethig S., Roberts K.** (1994). Clonal relationships and cell patterning in the root epidermis of Arabidopsis. *Development.* 120:2465-2474.
- Dolan L., Costa J.** (2001). Evolution and genetics of root hair stripes in the root epidermis. *J. Exp. Bot.* 52: 413-417.
- Dreher K.A., Brown J., Saw R.E., Callis J.** (2006). The Arabidopsis Aux/IAA protein family has diversified in degradation and auxin responsiveness. *Plant Cell* 18:699-714.
- Dubrovsky J.G., Rost T.L.** (2005). Pericycle. In: Roberts KR, ed. *Encyclopaedia of life sciences*. Chichester, UK: John Wiley and Sons Ltd, doi: 0.1038/npg.els.0002085.
- Ellis C.M., Nagpal P., Young J.C., Hagen G., Guilfoyle T.J., Reed J.W.** (2005). *AUXIN RESPONSE FACTOR1* and *AUXIN RESPONSE FACTOR2* regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 132: 4563-4574.
- Engstrom K., Lundgren L., Samuelsson G.** (1992). Bioassay-guided isolation of serotonin from fruits of *Solanum tuberosum* L. *Acta Pharm. Nord.* 4: 91-92.
- Falasca G., Altamura M. M.** (2003). Histological analysis of adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh seedlings. *Plant Biosystems. An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biol.* 137: 3, 265-273.
- Fellows L.E., Bell E.A.** (1970). 5-Hydroxy-L-tryptophan, 5-hydroxytryptamine and L-tryptophan 5-hydroxylase in *Griffonia simplicifolia*. *Phytochem.* 9: 2389-2396.
- Foreman J. Dolan L.** (2001). Root hairs as a model system for studying plant cell growth. *Ann. Bot.* 88: 1-7.
- Franco A., Gee M.A., Guilfoyle T.J.** (1990). Induction and superinduction of auxin-responsive genes with auxin and protein synthesis inhibitors. *J. Biol. Chem.* 265:15845-15849.
- Frazer A., Hensler J.G.** (1999). Understanding the neuroanatomical organization of serotonin cells in brain provides insight into functions of this neurotransmitter. In GJ Siegel, BWAgranoff, SK Fisher, RWAlbers, MD Uhler, ens, Basic Neurochemistry. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, pp 264-268.

- Fujita H., Syono K.** (1996). Genetic analysis of the effects of polar auxin transport inhibitors on root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 37: 1094-1101.
- Fukaki H., Tameda S., Masuda H., Tasaka M.** (2002). Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of *Arabidopsis*. *Plant J.* 29:153-168.
- Gee M.A., Hagen G., Guilfoyle T.J.** (1991). Tissue-specific and organ-specific expression of the auxin-responsive transcripts, SAURs and GH3, in soybean. *Plant Cell* 3: 419-430.
- Gil P., Liu Y., Orbovic V., Verkamp E., Poff K.L., Green P.** (1994). Characterization of the auxin-inducible SAUR-AC1 gene for use as a genetic tool in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 104: 777-784.
- Gray W., del Pozo J., Walker L., Hobbie L., Risseuw E., Banks T., Crosby W., Yang M., Ma H., Estelle M.** (1999). Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Development* 13: 1678-1691.
- Gray W.M., Kepinski S., Rouse D., Leyser O., Estelle M.** (2001). Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 414: 271-276.
- Gray W.M.** (2004). Hormonal Regulation of plant growth and development. *PLoS Biol.* 2:1270-1273.
- Grierson C., Schiefelbein J.** (2002). Root hairs. The *Arabidopsis* book. *Amer. Soc. Plant Biologist* 1-22.
- Grose W.** (1982). Function of serotonin of walnuts. *Phytochem.* 21: 819-822.
- Guilfoyle T.J., Hagen G., Li Y., Ulmasov T., Liu Z., Strabala T., Gee M.A.** (1993). Auxin-regulated transcription. *Aust. J. Plant Physiol.* 20: 489-502.
- Guilfoyle T.J., Ulmasov T., Hagen G.** (1998). The ARF family of transcription factors and their role in plant hormone responsive transcription. *Cell. Mol. Life Sci.* 54: 619-627.
- Guilfoyle T.** (2007). Sticking with auxin. *Nature* 446:621-622.
- Guilfoyle T.J., Hagen G.** (2007). Auxin response factors. *Curr Opin Plant Biol.* 10: 453-460
- Hagen G., Kleinschmidt A.J., Guilfoyle T.J.** (1984). Auxin-regulated gene expression in intact soybean hypocotyl and excised hypocotyl sections. *Planta* 16: 147-153.
- Hagen G., Guilfoyle T.** (2002). Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol. Biol.* 49: 373-385.
- Hannon J. Hoyer D.** (2008). "Molecular biology of 5-HT receptors". *Behav. Brain Res.* 195 (1): 198-213.
- Hardtke C.S., Kukurshumova W., Vidaurre D.P., Singh S.A., Stamatiou G., Tiwari S.B., Hagen G., Guilfoyle T.J., Berleth T.** (2004) Overlapping and non-redundant functions of the *Arabidopsis* auxin response factors *MONOPTEROS* and *NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL 4*. *Development* 131: 1089-1100.
- Hayashi K., Jones A.M., Ogino K., Yamazoe A., Oono Y., Inoguchi M., Kondo H., Nozaki H.** (2003). Yokonolide B, a novel inhibitor of auxin action, blocks degradation of AUX/IAA factors. *J. Biol. Chem.* 278: 23797-23806.
- Hayashi K., Tan X., Zheng N., Hatate T., Kimura Y., Kepinski S., Nozaki H.** (2008). Small-molecule agonists and antagonists of F-box protein-substrate interactions in auxin perception and signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 5632-5637.
- Henderson J., Baully J.M., Ashford D.A., Oliver S.C., Hawes C.R., Lazarus C.M., Venis M.A., Napier R.M.** (1997). Retention of maize auxin-binding protein in the endoplasmic reticulum: quantifying escape and the role of auxin. *Planta* 202: 313-323.
- Hershko A., Ciechanover A.** (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 425-479.
- Hertel R., Thomson K.S., Russo V.E.A.** (1972). In vitro auxin binding to particulate cell fractions from corn coleoptiles. *Planta* 107:325-340.
- Himanen K., Boucheron E., Vaneste S., Almeida-Engler J., Inzé D., Beeckamn T.** (2002). Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell* 14:2339-2351
- Hobbie L., Estelle M.** (1995). The *axr4* auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene important for root gravitropism and lateral root initiation. *Plant J.* 7: 211-220.

- Ishihara A., Hashimoto Y., Tanaka C., Dubouzet J., Nakao T., Matsuda F., et al.** (2008). The tryptophan pathway is involved in the defense responses of rice against pathogenic infection via serotonin production. *Plant J.* 54: 481-495.
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W.** (1987). GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907.
- Johnson M.A., Pérez-Amador M.A., Lidder P., Green P.J.** (2000). Mutants of *Arabidopsis* defective in a sequence-specific mRNA degradation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 13991-13996.
- Kang S., Kang K., Lee K., Back K.** (2007a). Characterization of tryptamine 5-hydroxylase and serotonin synthesis in rice plants. *Plant Cell Rep.* 26: 2009-2015.
- Kang S., Kang K., Lee K., Back K.** (2007b). Characterization of rice tryptophan decarboxylases and their direct involvement in serotonin biosynthesis in transgenic rice. *Planta* 227: 263-272.
- Kang K., Kang S., Lee K., Park M., Back K.** (2008). Enzymatic features of serotonin biosynthetic enzymes and serotonin biosynthesis in plants. *Plant Signal Behav.* 3: 389-390.
- Kang K., Kim Y.S., Park S., Back K.** (2009a). Senescence-induced serotonin biosynthesis and its role in delaying senescence in rice leaves. *Plant Physiol.* 150: 1380-1393.
- Kang K., Park S., Kim Y.S., Lee S., Back K.** (2009b). Biosynthesis and biotechnological production of serotonin derivatives. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 83: 27-34.
- Kende H., Zeevaart J.D.A.** (1997). The five “classical” plant hormones. *Plant Cell.* 9: 1197-1210.
- Kepinski S., Leyser O.** (2005). The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 446-451.
- Khan S., Stone J.M.** (2007). *Arabidopsis thaliana* GH3.9 influences primary root growth. *Planta* 226: 21-34.
- Kieffer M., Neve J., Kepinski S.** (2010). Defining auxin response contexts in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 12-20.
- Kim J., Harter K., Theologis A.** (1997). Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11786-11791.
- Kovtun Y., Chiu W.L., Tena G., Sheen J.** (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 2940-2945.
- Lau S., Jürgens G., De Smet I.** (2008). The evolving complexity of the auxin pathway. *Plant Cell* 20: 1738-1746.
- Lee M.M., Schiefelbein J.** (2002). Cell pattern in the *Arabidopsis* root epidermis determined by lateral inhibition with feedback. *Plant Cell* 14: 611-618.
- Leyser O.** (2006). Dynamic integration of auxin transport and signaling. *Curr Biol.* 16: R424-R433.
- Li Y., Liu Z.B., Shi X., Hagen G., Guilfoyle T. J.** (1994). An Auxin-Inducible Element in Soybean SAUR Promoters. *Plant Physiol.* 106: 37-43.
- Li Y., Wu Y.H., Hagen G., Guilfoyle T.J.** (1999). Expression of the auxin-inducible GH3 promoter GUS fusion gene as a useful molecular marker for auxin physiology. *Plant Cell Physiol.* 40: 675-682.
- Lincoln C., Britton J.H., Estelle M.** (1990). Growth and development of the *axr1* mutant of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2: 1071-1080.
- Liscum E., Reed J.W.** (2002). Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol. Biol.* 49: 387-400.
- Liu Z.B., Ulmasov T., Shi X., Hagen G., Guilfoyle T.J.** (1994). Soybean GH3 promoter contains multiple auxin-inducible elements. *Plant Cell* 6: 645-657.
- Li-zhen Tao., Cheung Y.A., Hen-ming Wu.** (2002). Plant Rac-Like GTPases are activated by auxin and mediate auxin-responsive Gene Expression. *Plant Cell* 14: 2745-2760.
- Ljung K., Bhalerao R.P., Sandberg G.** (2001). Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J.* 28:465-474.

- Ljung K., Hull A.K., Kowalczyk M., Marchant A., Celenza J., Cohen J.D., et al.** (2002). Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 50: 309-332.
- López-Bucio J., Cruz-Ramírez A., Herrera-Estrella L.** (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 280-287.
- López-Bucio J., Cruz-Ramírez A., Pérez-Torres A., Ramírez-Pimentel J.G., Sánchez-Calderón L., Herrera-Estrella L.** (2005). Root architecture. In: Plant architecture and its manipulation. Blackwell Annual Review Series. Turnbull, C. (Ed.) pp 182-208.
- López-Bucio J., Acevedo-Hernández G., Ramírez-Chávez E., Molina-Torres E., Herrera-Estrella L.** (2006). Novel signals for plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 280-287.
- Malamy J.E., Benfey P.N.** (1997a). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124: 33-44.
- Malamy J., Benfey P.** (1997b). Down and out in *Arabidopsis*: the formation of lateral roots. *Trends Plant Sci.* 2: 390-401.
- Mallory A.C., Bartel D.P., Bartel B.** (2005). MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17* is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell* 17:1360-1375.
- Marchant A., Kargul J., May S.T., Muller P., Delbarre A., Perrot-Rechenmann C., Bennett M.J.** (1999). AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO J.* 18: 2066-2073.
- McCarty D.R., Chory J.** (2000). Conservation and innovation in plant signaling pathways. *Cell* 103: 201-209.
- McClure B.A., Guilfoyle T.** (1987). Characterization of a class of small auxin-inducible soybean polyadenylated RNAs. *Plant Mol. Biol.* 9: 611-623.
- McClure B.A., Guilfoyle T.J.** (1989). Rapid redistribution of auxin-regulated RNAs during gravitropism. *Science* 243: 91-93.
- McClure B.A., Hagen G., Brown C.S., Gee M.A., Guilfoyle T.J.** (1989). Transcription, organization, and sequence of an auxinregulated gene cluster in soybean. *Plant Cell* 1: 229-239.
- Mockaitis K., Estelle M.** (2008). Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24: 55-80.
- Moller S.G., Chua N.H.** (1999). Interactions and intersections of plant signaling pathways. *J. Mol. Biol.* 293: 219-234.
- Morgan K.E., Zarembinski T.I., Theologis A., Abel S.** (1999). Biochemical characterization of recombinant polypeptides corresponding to the predicted β aa fold in Aux IAA proteins. *FEBS Lett.* 454: 283-287.
- Morquecho-Contreras A., López-Bucio J.** (2007). Cannabinoid-like signaling and other new developmental pathways in plants. *Int. J. Plant Dev. Biol.* 1:34-41.
- Mravec J., Kubes M., Bielach A., Gaykova V., Petrášek J., Skupa P., Chand S., Benková E., Zažímalova E., Friml J.** (2008). Interaction of PIN and PGP transport mechanisms in auxin distribution-dependent development. *Development* 135: 3345-3354.
- Murch S.J., Campbell S.S.B., Saxena P.** (2001). The role of serotonin and melatonin in plant morphogenesis: regulation of auxin-induced root organogenesis in in vitro-cultured explants of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *In vitro Cell Dev. Biol. Plant* 37: 786-793.
- Nagpal P., Walker L., Young J.C., Sonawala A., Timpte C., Estelle M., Reed J.W.** (2000). AXR2 encodes a member of the Aux/IAA protein family. *Plant Physiol.* 123: 563-573.
- Nagpal P., Ellis C.M., Weber H., Ploense S.E., Barkawi L.S., Guilfoyle T.J., Hagen G., Alonso J.M., Cohen J.D., Farmer E.E., Ecker J.R., Reed J.W.** (2005) Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* 132: 4107-4118.

- Napier R.M., David K.M., Perrot-Rechenmann C.** (2002). A short history of auxin-binding proteins. *Plant Mol. Biol.* 49: 339-348.
- Nichols D.E., Nichols C.D.** (2008). "Serotonin receptors". *Chem. Rev.* 108 (5): 1614-41.
- Odjakova M., Hadjiivanova C.** (1997). Animal neurotransmitter substances in plants. *Bulg. J. Plant Physiol.* 23: 94-102.
- Oono Y., Chen Q.G., Overvoorde P.J., Kohler C., Theologis A.** (1998). *age* mutants of Arabidopsis exhibit altered auxin-regulated gene expression. *Plant Cell* 10: 1649-1662.
- Oono Y., Ooura C., Rahman A., Aspúria E., Hayashi K., Tanaka A., Uchimiya H.** (2003). *p*-Chlorophenoxyisobutyric acid impairs auxin response in Arabidopsis root. *Plant Physiol.* 133: 1135-1147.
- Okushima Y., Overvoorde P.J., Arima K., Alonso J.M., Chan A., Chang C., Ecker J.R.** (2005). Functional Genomic Analysis of the *AUXIN RESPONSE FACTOR* Gene Family Members in *Arabidopsis thaliana*: Unique and Overlapping Functions of *ARF7* and *ARF19*. *Plant Cell* 17: 444-463.
- Okushima Y., Fukaki H., Onoda M., Theologis A., Tasaka M.** (2007) *ARF7* and *ARF19* regulate lateral root formation via direct activation of *LBD/ASL* genes in Arabidopsis. *Plant Cell* 19: 118-130.
- Ouellet F., Overvoorde P.J., Theologis A.** (2001). *IAA17/AXR3*: biochemical insight into an auxin mutant phenotype. *Plant Cell* 13: 829-841.
- Overvoorde P., Fukaki H., Beeckman T.** (2010). Auxin control of root development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2:a001537.
- Palme K., Hesse T., Campos N., Garbers C., Yanofsky M.F., Schell J.** (1992). Molecular analysis of an auxin binding protein gene located on chromosome 4 of Arabidopsis. *Plant Cell* 4: 193-201.
- Patton E.E., Willems A.R., Tyers M.** (1998). Combinatorial control in ubiquitin dependent proteolysis: do not Skp the F-box hypothesis. *Trends Genet.* 14: 236-243.
- Péret B., de Rybel B., Casimiro I., Benková E., Swarup R., Laplace L., Beeckman T., Bennett M.J.** (2009). Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci.* 14: 399-408.
- Pickett F.B., Wilson A.K., Estelle M.** (1990). The *aux1* mutation of Arabidopsis confers both auxin and ethylene resistance. *Plant Physiol.* 94: 1462-1466.
- Pitts R.J., Cernac A., Estelle M.** (1998). Auxin and ethylene promote root hair elongation in Arabidopsis. *Plant J.* 16: 553-560.
- Quint M., Gray W.M.** (2006). Auxin signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9(5): 448-453.
- Radwanski E.R., Last R.L.** (1995). Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics. *Plant Cell* 7: 921-934.
- Rogg L.E., Bartel B.** (2001). Auxin signaling: derepression through regulated proteolysis. *Development Cell* 1: 595-604.
- Rogg L.E., Lasswell J., Bartel, B.** (2001). A gain-of-function mutation in *IAA28* suppresses lateral root development. *Plant Cell* 13: 465-480.
- Ruegger M., Dewey E., Gray W.M., Hobbie L., Turner J., Estelle M.** (1998). The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes Development* 12: 198-207.
- Roshchina V.V.** (2001). Neurotransmitters in plant life. *Science Publishers*, Enfield, NH, pp 4-81.
- Santner A., Calderon-Villalobos L.I.A., Estelle M.** (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat. Chem. Biol.* 5: 301-307.
- Scheres B., Wolkenfelt H.** (1998). The Arabidopsis root as a model to study plant development. *Plant Physiol. Biochem.* 36: 21-32.
- Schiefelbein J.W., Masucci J.D., Wang H.** (1997). Bulding a root: the control of patterning and morphogenesis during root development. *Plant Cell* 9:1089-1098.
- Sieberer T., Hauser M.T., Seifert G.J., Lusching C.** (2003). *PROPORZ1*, a putative Arabidopsis transcriptional adaptor protein, mediates auxin and cytokinin signals in the control of cell proliferation. *Curr. Biol.* 13: 837-842.

- Staswick P.E.** (2009). The tryptophan conjugates of jasmonic acid and indole-3-acetic acids are endogenous auxin inhibitors. *Plant Physiol.* 150: 1310-1321.
- Steffens B., Feckler C., Palme K., Christian M., Bottger M., Luthen H.** (2001). The auxin signal for protoplast swelling is perceived by extracellular ABP1. *Plant J.* 27, 591-599.
- Sullivan M.L., Green P.J.** (1996). Mutational analysis of the DST element in tobacco cells and transgenic plants: identification of residues critical for mRNA instability. *RNA* 2: 308-315.
- Swarup R., Kargul J., Marchant A., Zadik D.P., Rahman A., Mills R., Yemm A., May S., Williams L., Millner P., Tsurumi S., Moore I., Napier R., Kerr I.D., Bennett M.J.** (2004). Structure-function analysis of the presumptive Arabidopsis auxin permease AUX1. *Plant Cell* 16: 3069-3083.
- Tan X., Calderon-Villalobos L.I., Sharon M., Zheng C., Robinson C.V., Estelle M., Zheng N.** (2007). Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* 446: 640-645.
- Tatematsu K., Kumagai S., Muto H., Sato A., Watahiki M.K., Harper R.M., Liscum E., Yamamoto K.T.** (2004). *MASSUGU2* encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16: 379-393.
- Tian Q., Reed J.W.** (1999). Control of auxin-regulated root development by the *Arabidopsis thaliana* *SHY2/IAA3* gene. *Development* 126: 711-721.
- Timpfe C., Wilson A.K., Estelle M.** (1994). The *axr2-1* mutation of *Arabidopsis thaliana* is a gain-of-function mutation that disrupts an early step in auxin response. *Genetics* 138: 1239-1249.
- Tiwari S.B., Hagen G., Guilfoyle T.** (2003). The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell* 15:533-43
- Tiwari S.B., Wang X.J., Hagen G., Guilfoyle T.J.** (2001). AUX/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin. *Plant Cell* 13: 2809-2822.
- Tromas A., Braun1 N., Muller P., Khodus T., Paponov I.A., Palme A., Ljung K., Lee J., Benfey P., Murray J.A.H. , Scheres B., Perrot-Rechenmann C.** (2009). The AUXIN BINDING PROTEIN 1 Is Required for Differential Auxin Responses Mediating Root Growth. *PLOS ONE* 4 (9): 1-11.
- Tyers M., Willems A.R.** (1999). One ring to rule a superfamily of E3 ubiquitin ligase. *Science* 284: 601-604.
- Uehara T., Okushima Y., Mimura T., Tasaka M., Fukaki H.** (2008). Domain II mutation in CRANE/IAA18 suppress lateral root formation and affect shoot development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 49: 1025-1038.
- Ullah H., Chen J.G., Wang S., Jones A.M.** (2002). Role of the heterotrimeric G protein in regulation of Arabidopsis seed germination. *Plant Physiol.* 129: 897-907.
- Ullah H., Chen J.G., Young J.G., Sussman M.R., Jones A.M.** (2003). Modulation of cell proliferation by heterotrimeric G protein in Arabidopsis. *Science* 292: 2066-2069.
- Ulmasov T., Hagen G., Guilfoyle T.J.** (1997a). ARF1, a transcription factor that binds auxin response elements. *Science* 276: 1865-1868.
- Ulmasov T., Murfett J., Hagen G., Guilfoyle T.** (1997b). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9: 1963-1971.
- Ulmasov T., Hagen G., Guilfoyle T.J.** (1999a). Activation and repression of transcription by auxin response factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5844-5849.
- Ulmasov T., Hagen G., Guilfoyle T.J.** (1999b). Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *Plant J.* 19: 309-319.
- Veenstra-VanderWeele J., Anderson G.M., Cook E.H.** (2000). Pharmacogenetics and the serotonin system: initial studies and future directions. *J. Pharmacol.* 410: 165-181
- Vieten A., Saver M., Brewer P.B., Friml J.** (2007). Molecular and cellular aspects of auxintransport-mediated development. *Trends Plant Sci.* 12: 160-168.
- Walch-Liu P., Lai-Hua L., Remans T., Tester M., Forde B.G.** (2006). Evidence that L-glutamate can act as an exogenous signal to modulate root growth and branching in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 47: 1045-1057.

- Walker J.C., Key J.L.** (1982). Isolation of cloned cDNAs to auxin-responsive poly(A)⁺ RNAs of elongating soybean hypocotyl. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 7185-7189.
- Wang X.Q., Ullah H., Jones A.M., Assman S.M.** (2001). G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Science* 292: 2070-2072.
- Wang J.W., Wang L.J., Mao Y.B., Cai W.J., Xue H.W., Chen X.Y.** (2005). Control of root cap formation by MicroRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17:2204-2216.
- Woodward A.W., Bartel B.** (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann. Bot.* 95: 707-735.
- Yamamoto K.T., Mori H., Imaseki H.** (1992). cDNA cloning of indole-3-acetic acid-regulated genes: *Aux22* and *SAUR* from mung bean (*Vigna radiata*) hypocotyl tissue. *Plant Cell Physiol.* 33: 93-97.
- Yamazoe A., Hayashi K., Kepinski S., Leyser O., Nozaki H.** (2005). Characterization of Terfestatin A, a new specific inhibitor for auxin signaling. *Plant Physiol.* 139:779-789.
- Yang T., Poovaiah B.W.** (2000). Molecular and biochemical evidence for the involvement of calcium/calmodulin in auxin action. *J. Biol. Chem.* 275: 3137-3143.
- Zenser N., Ellsmore A., Leasure C., Callis J.** (2001). Auxin modulates the degradation rate of Aux/IAA proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11795-11800.
- Zazímolová E., Murphy A.S., Yang H., Hoyerová K., Hosek P.** (2010). Auxin Transporters – Why So Many? *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2:a001552.

10. APÉNDICE.

Relación de publicaciones con arbitraje estricto generadas durante la realización del presente trabajo:

1. **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 and Cell Physiology*. 0(0):1-19 doi:10.1093/pcp/pcr006.

2. Morquecho-Contreras A., Méndez-Bravo A., **Pelagio-Flores R.**, Raya-González J., Ortíz-Castro R., López-Bucio J. (2010). Characterization of *drr1*, an alkamide-resistant mutant of *Arabidopsis*, reveals an important role for small lipid amides in lateral root development and plant senescence. *Plant Physiology* 152: 1659-1673.

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

Capítulo en libro:

1. **Pelagio-Flores R.**, Beltrán-Peña E., López-Bucio J. (2010). Distribución y funciones de la serotonina y la melatonina en las plantas. FRONTERAS EN LA BIOLOGÍA DEL DESARROLLO DE LAS PLANTAS. Volumen 1. Eds. Beltrán-Peña E., López-Bucio J. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. pp. 72-85.

Serotonin, a Tryptophan-Derived Signal Conserved in Plants and Animals, Regulates Root System Architecture Probably Acting as a Natural Auxin Inhibitor in *Arabidopsis thaliana*

Ramón Pelagio-Flores, Randy Ortíz-Castro, Alfonso Méndez-Bravo, Lourdes Macías-Rodríguez and Jose López-Bucio*

5 Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B3, Ciudad Universitaria. CP 58030 Morelia, Michoacán, México

*Corresponding author: E-mail, jlbucio@zeus.umich.mx; Fax, +443-3265788

(Received September 25, 2010; Accepted January 11, 2011)

Serotonin (5-hydroxytryptamine) is a well-known neurotransmitter in mammals and is widely distributed in plants. This compound is synthesized from tryptophan and shares structural similarity with IAA. To date, little is known about the morphological, physiological and molecular responses of plants to serotonin. In this study, we characterized the effects of serotonin on growth and development in *Arabidopsis thaliana* seedlings. Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) analysis showed that plants are able to take up serotonin from the growth medium, which coincided with greatly stimulated lateral root development at concentrations from 10 to 160 μ M. In contrast, higher doses of serotonin repressed lateral root growth, primary root growth and root hair development, but stimulated adventitious root formation. To investigate the role of serotonin in modulating auxin responses, we performed experiments using transgenic *Arabidopsis* lines expressing the auxin-responsive marker constructs *DR5::uidA*, *BA3::uidA* and *HS::AXR3NT-GUS*, as well as a variety of *Arabidopsis* mutants defective at the *AUX1*, *AXR1*, *AXR2* and *AXR4* auxin-related loci. We found that serotonin strongly inhibited both *DR5::uidA* and *BA3::uidA* gene expression in primary and adventitious roots and in lateral root primordia. This compound also abolished the effects of IAA or naphthaleneacetic acid on auxin-regulated developmental and genetic responses, indicating an anti-auxin activity in the plant. Mutant analysis further showed that lateral root induction elicited by serotonin was independent of the *AUX1* and *AXR4* loci but required *AXR1* and *AXR2*. Our results show that serotonin regulates root development probably by acting as a natural auxin inhibitor.

Keywords: *Arabidopsis* • Auxin signaling • Root architecture • Serotonin.

Abbreviations: ARF, auxin response factor; ER, endoplasmic reticulum; GC-MS, gas chromatography–mass spectrometry; GUS, β -glucuronidase; MS, Murashige and Skoog; NAA,

naphthaleneacetic acid; NPA, 1-naphthylphthalamic acid; LR, lateral root; LRP, lateral root primordium; PAT, polar auxin transport; PCIB, *p*-chlorophenoxyisobutyric acid; RNAi, RNA interference; TDC, tryptophan decarboxylase; TIBA, triiodobenzoic acid; WT, wild-type; YFP, yellow fluorescent protein.

Introduction

Plants synthesize and use a variety of signals to adjust growth and development throughout their life cycle. Auxins, including IAA, comprise a group of tryptophan-derived signals, which are involved in most aspects of plant development (Woodward and Bartel 2005). Extensive studies over the past decade have investigated the factors involved in the regulation of plant morphogenesis by auxins. These compounds exert a strong biological activity at very low concentrations in both in vivo and in vitro systems and are essential for maintenance of physiological and morphogenetic processes including gravity and light responses, root hair development, and lateral root (LR), adventitious root and shoot system development (Woodward and Bartel 2005). Optimal plant growth requires tight control of IAA activity, which is accomplished by diverse mechanisms that include IAA biosynthesis, its transport among tissues, cycling between active and inactive forms of auxin, and signal perception through a family of IAA receptors (Ljung et al. 2002, Leyser 2006, Mockaitis and Estelle 2008).

Although IAA is among the most highly characterized metabolites of tryptophan, relatively high levels of IAA-related compounds have been reported in plants such as the mammalian neurotransmitter serotonin (5-hydroxytryptamine). This compound is a ubiquitous signal, which plays multiple roles in neurotransmission, hormone and mitogenic functions as well as acting in immunomodulatory and anti-inflammatory processes in animal cells (Frazer and Hensler 1999). In plants, serotonin has been found in roots, leaves, fruits and seeds from

at least 42 species (Grose 1982, Engstrom et al. 1992, Roshchina 2001). Serotonin has been implicated in important physiological and developmental functions including flowering, senescence, shoot formation and defense responses (Odjakova and Hadjiivanova 1997, Murch et al. 2001, Roshchina 2001, Ishihara et al. 2008, Kang et al. 2009a).

Serotonin biosynthesis occurs via two enzymatic steps. Tryptophan decarboxylase (TDC) catalyzes the conversion of tryptophan into tryptamine, followed by tryptamine 5-hydroxylase (T5H), which hydroxylates the C-5 position of tryptamine to form serotonin (Kang et al. 2007a, Kang et al. 2007b, Kang et al. 2008, Kang et al. 2009b). In leaves and seeds of rice (*Oryza sativa*) plants, TDC expression is very low or negligible. In leaves, the serotonin concentration was reported to be around $0.3 \mu\text{g g}^{-1}$ FW. However, levels greatly increase in response to senescence signals such as nutrient deprivation or leaf detachment, and serotonin synthesis is closely coupled with transcriptional and enzymatic induction of tryptophan biosynthetic genes as well as TDC in senescing leaves (Kang et al. 2009a). Transgenic rice plants overexpressing TDC produced 25-fold higher serotonin levels than wild-type (WT) plants and showed delayed leaf senescence, whereas lines in which expression of TDC was suppressed through an RNA interference (RNAi) system produced less serotonin and senesced faster than the WT line (Kang et al. 2009a). Serotonin accumulation was also reported to occur in rice leaves infected by the fungal pathogen *Bipolaris oryzae* (Ishihara et al. 2008). Serotonin accumulation was preceded by a transient increase in tryptamine content and by marked activation of TDC. Serotonin treatment suppressed the growth of fungal hyphae, indicating that the activation of the tryptophan pathway is involved in the establishment of effective defenses against the pathogen through serotonin production in rice plants. Collectively, this information indicates that serotonin levels in plant tissues may increase by demand, under particular developmental transitions or when challenged by pathogens.

Although serotonin is naturally present in a wide variety of plants, little is known about the molecular mechanisms involved in plant developmental responses to this compound. The Arabidopsis root system is an excellent model to characterize the effects of compounds with novel and interesting activities in plants (López-Bucio et al. 2006, Contreras-Cornejo et al. 2009). Roots perform the essential activities of providing water, nutrients and physical support to the plant. The primary root originates in the embryo and produces many LR during the lifetime of a plant, and each of these will produce more LRs. The quantity and placement of these structures determine the architecture of the root system, and this in turn plays a major role in determining whether a plant will survive in a particular climate or environment (Malamy and Benfey 1997b, Casimiro et al. 2003, López-Bucio et al. 2005). During the post-embryonic development of plants, new axes of growth emerge from shoot tissues through adventitious organogenesis. This is particularly important in crops such as maize, in which adventitious root formation provides a flexible

way for plants to alter their form and resource allocation in response to environmental changes or after injury. While LRs typically form from lateral root primordia (LRPs) initiated on the primary root pericycle, adventitious roots form naturally from stem tissue. LR and adventitious root formation is a complex process affected by multiple endogenous factors, including phytohormones such as auxin, and environmental factors such as light and nutrient deprivation (Casimiro et al. 2003, López-Bucio et al. 2003, Péret et al. 2009).

The control of post-embryonic root growth and LR formation is tightly regulated by auxin (IAA). IAA moves throughout the plant in the phloem or by a more controlled polar transport system [polar auxin transport (PAT)]. PAT is a process regulated by AUXIN RESISTANT 1/LIKE AUX1 (AUX1/LAX) uptake proteins, PIN-FORMED (PIN) efflux carriers and P-GLYCOPROTEIN (MDR/PGP/ABCB) efflux/conditional transporters (Swarup et al. 2004; Mravec et al. 2008). There are several Arabidopsis mutants defective in the production of auxin transport proteins or in the correct location of these proteins that show auxin-related phenotypes, including *aux1-7* and *axr4-1*. The *aux1-7* mutant is defective at the AUX1 locus encoding an auxin influx transporter (Swarup et al. 2004), while the *axr4-1* mutant is defective in an accessory protein of the endoplasmic reticulum (ER) that regulates localization of AUX1 proteins. Loss of AXR4 results in abnormal accumulation of AUX1 in the ER of epidermal cells, indicating that the *axr4* agravitropic phenotype is caused by defective AUX1 trafficking in the root epidermis (Dharmasiri et al. 2006).

Auxin is perceived by the TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1/AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEIN 1-3 (TIR1/AFB1-3) receptor family. TIR1 is part of the ubiquitin-ligase complex SCF^{TIR1/AFB} that catalyzes the ubiquitination and destruction of AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID (AUX/IAA) proteins (Gray et al. 2001, Dharmasiri et al. 2005, Kepinski et al. 2005). These proteins, under low auxin concentrations, form dimers with the auxin response transcription factors (ARFs), thereby blocking their activity. The Arabidopsis *auxin-resistant 1* (*axr1*) mutants were initially isolated in a screen for auxin non-responsive seedlings (Lincoln et al. 1990). Subsequent analysis demonstrated that AXR1 is a subunit in the related to ubiquitin (RUB)-activating enzyme, the first enzyme in the pathway that conjugates the ubiquitin-related protein RUB to members of the ubiquitin protein ligases (del Pozo et al. 2002). Once freed from the AUX/IAAs, ARFs regulate the expression of auxin-responsive genes (Lau et al. 2008, Kieffer et al. 2010). Gain-of-function mutations in *IAA3/SHY2*, *IAA7/AXR2*, *IAA12/BDL*, *IAA14/SLR*, *IAA18/CRANE*, *IAA19/MSG2* and *IAA28* genes lead to plants with altered root development (Tian and Reed 1999, Nagpal et al. 2000, Rogg et al. 2001, Fukaki et al. 2002, Tatematsu et al. 2004, Uehara et al. 2008). The *slr* and *iaa28* gain-of-function mutants show a strong reduction in LR formation (Rogg et al. 2001, Fukaki et al. 2002). These observations indicate that the AUX/IAA proteins function as negative regulators of LR development, although a detailed direct

comparison of the LR phenotypes of these mutants has not been performed.

Based on its structural similarity to IAA, we hypothesized that serotonin might act through a canonical auxin signaling pathway to modulate developmental responses by either activating or repressing auxin responses. We therefore characterized the effects of serotonin on root system architecture and auxin-mediated responses in *Arabidopsis thaliana*. Interestingly, our results show that the supply of serotonin has a dual effect on LR formation, stimulating it at low (10–160 μM) concentrations, but with repressing effects at higher (150–600 μM) concentrations. Although at high concentrations serotonin also induced adventitious root formation, it repressed typical auxin responses such as primary root growth and root hair formation. Moreover, an analysis of root architecture responses in the *aux1-7*, *axr1-3*, *axr2-1* and *axr4-1* *Arabidopsis* auxin-related mutants and auxin-inducible gene expression tests revealed that serotonin may act as a natural auxin inhibitor in plants.

Results

Serotonin affects *Arabidopsis thaliana* root system architecture

Serotonin and IAA are tryptophan-derived compounds, with similar chemical structures (Fig. 1). To evaluate the effects of serotonin on plant growth and development, we used *A. thaliana* as a model system. *Arabidopsis thaliana* (Col-0) seedlings were grown in Petri plates containing solid 0.2 $\times$ Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with the solvent or with increasing concentrations of serotonin from 10 to 160 μM . Twelve days after germination, the primary root length, LR number and LR density were determined for 30 seedlings. We found that serotonin strongly promoted LR development, without affecting primary root growth. This leads to plants with increased LR number and density (LR cm^{-1}) (Fig. 2A–D).

An important developmental trait widely used to monitor auxin responses is primary root growth (Woodward and Bartel 2005). To determine whether serotonin treatments of

>160 μM could affect primary root growth and other root architectural parameters, *Arabidopsis* seedlings were supplied with 150–600 μM serotonin. It could be seen that both LR number and density increased at a serotonin concentration of 150 μM but decreased at greater concentrations of this compound (Fig. 3B, C). Supplementary Fig. S1 illustrates the root architectural responses of *Arabidopsis* seedlings to high serotonin concentrations; it can be seen that this compound dramatically inhibits primary root growth while promoting root branching caused by proliferation of adventitious roots. Our results show that serotonin has a dual effect in modulating root system architecture, promoting LR development at low concentrations (10–160 μM) but inhibiting primary root growth and LR development at higher concentrations.

Serotonin affects cell division and cell growth in *Arabidopsis* roots

The post-embryonic root developmental effects of high serotonin concentrations in *Arabidopsis* seedlings suggested that this compound could play an important role in cell division and/or cell elongation. To study the effects of this compound on cell division and elongation, we measured the length of both fully developed cortical cells from the differentiation region and the primary root meristem from 7 d old WT *Arabidopsis* (Col-0) seedlings. In addition, we analyzed the expression of *pPRZ1:uidA*, which marks only active meristems (Sieberer et al. 2003), and *CyCB1:uidA*, which is expressed only in cells in the G₂/M phase of the cell cycle and is a marker of mitotic activity (Colón-Carmona et al. 1999). Strong primary root growth inhibition under concentrations of serotonin $\geq 300 \mu\text{M}$ correlated with both decreased cell size of cortical cells and the loss of β -glucuronidase (GUS) expression in the primary root meristem of *pPRZ1:uidA* and *CyCB1:uidA* transgenic seedlings (Fig. 4A–C). In addition to these effects, meristem length significantly decreased from 300 μm in solvent-treated seedlings to 220 μm at a concentration of 600 μM serotonin. These results indicate that serotonin inhibits primary root growth by affecting both cell division and elongation.

Serotonin induces lateral root growth but not lateral root primordia initiation

To determine whether serotonin promotes LR development by stimulating LRP growth or inducing de novo formation of LRPs, or modulating both of these processes, we investigated the stages of LRP development affected by serotonin. LRPs were quantified 7 d after germination in plants treated with the solvent or with 150 μM serotonin, which increases LR number and density without affecting primary root growth (Fig. 2). Seedling roots were first cleared to enable LRPs at early stages of development to be visualized and counted. Each LRP was classified according to its stage of development as reported by Malamy and Benfey (1997a). We found that the stage distribution of LRPs was affected by treatment with serotonin. In particular, LRP stage I, which describes LRPs at the earliest stage of

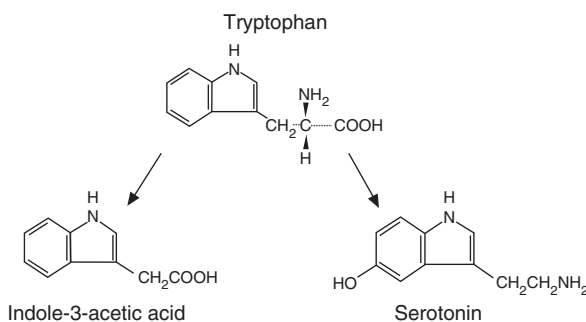


Fig. 1 Comparative chemical structures of serotonin (*N*-acetyl-5-hydroxytryptamine), IAA and their common precursor tryptophan.

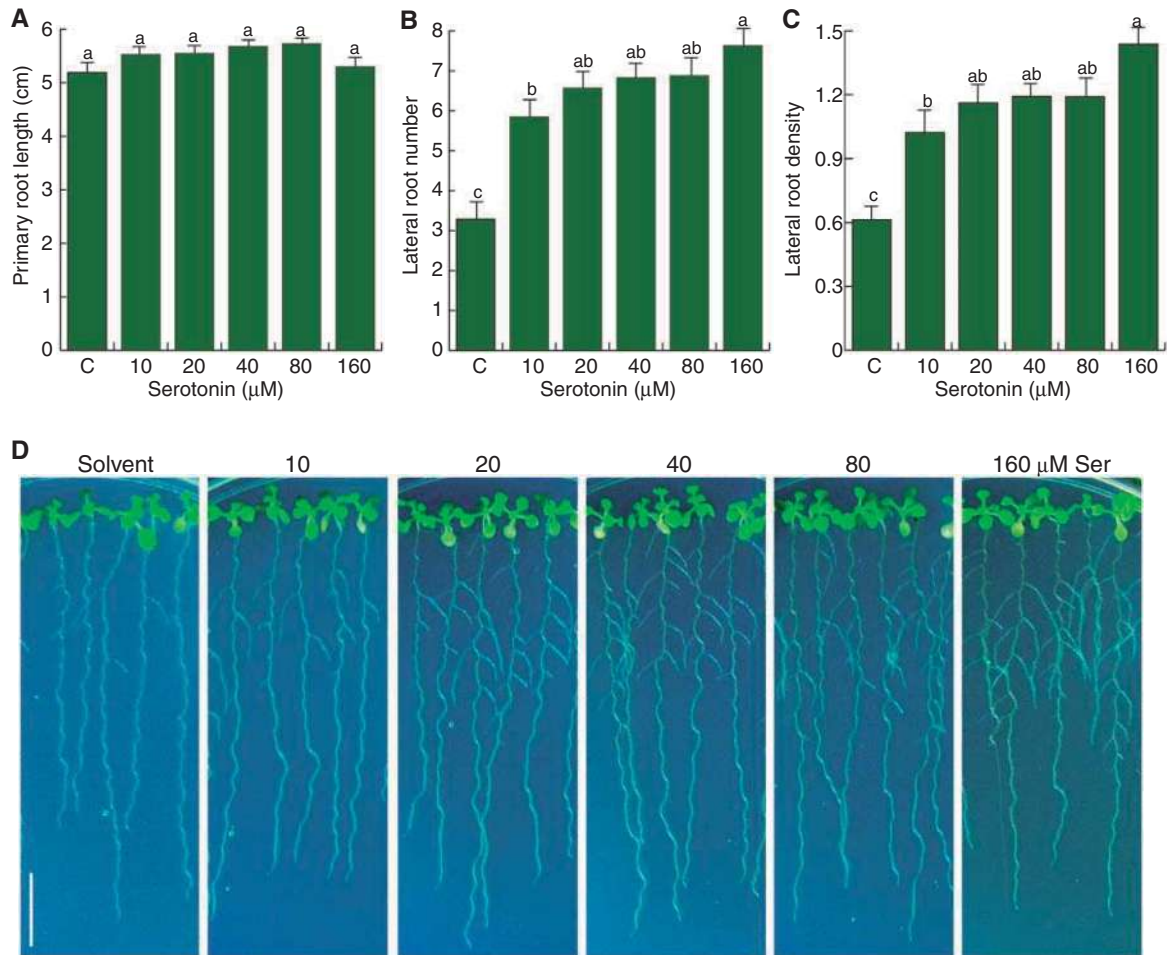


Fig. 2 Effects of low serotonin concentrations on Arabidopsis root system architecture. Arabidopsis Col-0 seedlings were germinated and grown for 12 d under increasing serotonin concentrations. (A) Primary root length. (B) Lateral root number. (C) Lateral root density. Values shown represent the means of 30 seedlings $\pm$ SD. Different letters represent means statistically different at the 0.05 level. (D) Representative photographs of Arabidopsis seedlings grown in the indicated serotonin treatments. The experiment was repeated twice with similar results. Scale bar = 1 cm.

development, was significantly decreased in serotonin-treated seedlings (Fig. 5A). In marked contrast, LRP stage VII, covering the most developed LRPs giving rise to emerged LRs, was induced 3-fold by serotonin (Fig. 5A). The total number of LRPs per seedling did not change in response to serotonin treatments (Fig. 5B). These data suggest that serotonin did not induce de novo LRP initiation and probably increases root branching in Arabidopsis by inducing the maturation of pre-formed LRPs from pericycle cells.

10 Serotonin promotes adventitious root development

To determine whether serotonin is involved in regulation of proliferative events in the shoot system, we assessed its regenerative properties by cultivating stem explants from etiolated Arabidopsis seedlings under increasing concentrations of serotonin and monitoring adventitious root formation as reported by Campos-Cuevas et al. (2008). Arabidopsis explants treated

with 150–600 μM serotonin showed a roughly 2-fold increase in adventitious root number compared with solvent-treated explants (Fig. 6A). Fig. 6B and C shows representative photographs of the effects of serotonin on adventitious root formation. This result illustrates that serotonin is a compound with a strong effect on Arabidopsis adventitious root organogenesis.

25 Serotonin inhibits root hair development and expansin gene expression

The serotonin effects of inhibiting primary root growth and promoting adventitious root formation are reminiscent of those caused by treating plants with auxins (Woodward and Bartel 2005). Auxins have also been found to induce root hair development in several plant species (Parker et al. 2000). To determine whether serotonin could affect root hair development, we performed experiments in which Arabidopsis seedlings were germinated and grown in Petri plates containing 0.2× agar-MS medium supplemented with increased

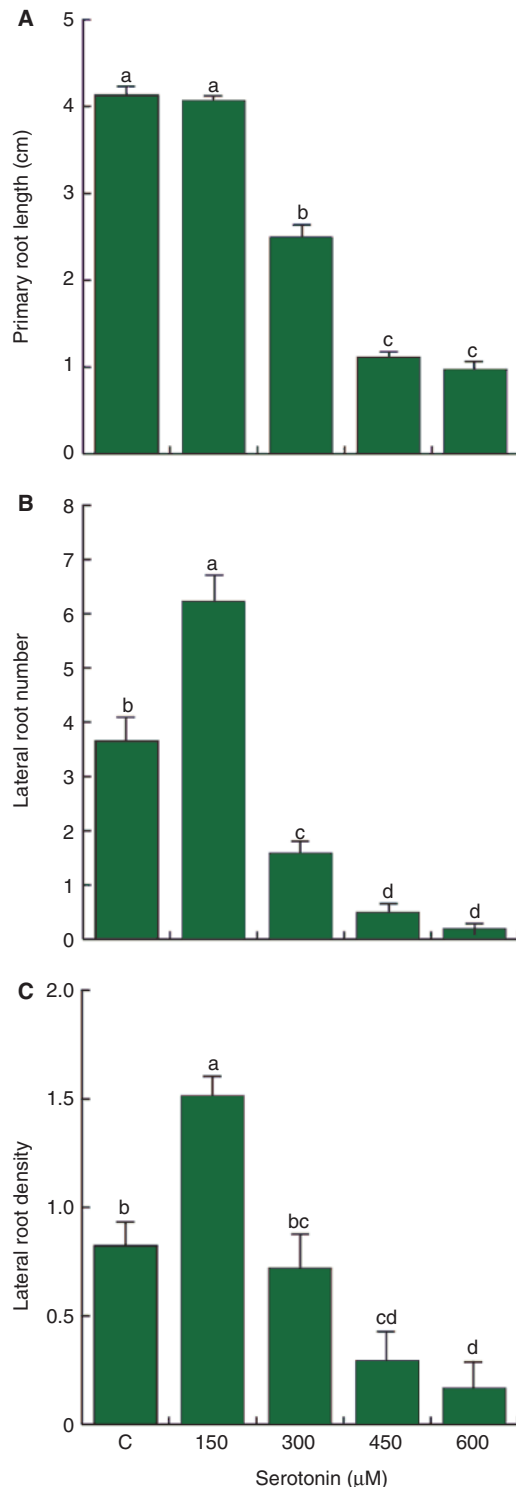


Fig. 3 Effects of high serotonin concentrations on Arabidopsis root system architecture. Arabidopsis Col-0 seedlings were germinated and grown for 10 d under increasing serotonin concentrations. (A) Primary root length. (B) Lateral root number. (C) Lateral root density. Values shown represent the means of 30 seedlings $\pm$ SD. Different letters represent means statistically different at the 0.05 level. The experiment was repeated twice with similar results.

concentrations of the compound, and 5 d after germination root hairs from the differentiation and maturation zones of the primary root were analyzed. In marked contrast to adventitious root development, serotonin treatments dramatically inhibited root hair development both in the differentiation zone and in the maturation zone (Fig. 7A). Next, we determined whether the compound altered root hair initiation, root hair elongation or both, by microscopically counting and measuring trichoblast cells present in the maturation zone of the primary root. It was found that 150 μ M serotonin significantly inhibited root hair growth, while increased concentrations dramatically blocked hair growth (Fig. 7B). The root hair density analysis showed that serotonin also inhibited root hair formation in a dose-dependent way (Fig. 7C). To determine whether serotonin affects root hair formation at an early step in development, we used the *pAtEXP7:uidA* transgenic line, which expresses GUS in trichoblast cells and is a marker of root hair initiation (Cho and Cosgrove 2002). Serotonin produced a deficient cell differentiation program in root epidermal cells, evidenced by loss of GUS expression in trichoblast cells in serotonin-treated seedlings (Fig. 7D).

GC-MS analysis of serotonin levels in *A. thaliana* seedlings

To determine whether serotonin is naturally produced in *A. thaliana* and if the effects observed on root system architecture correlated with serotonin accumulation in plant tissues, we performed experiments to quantify serotonin from root and shoot tissues from solvent- or serotonin-treated WT (Col-0) seedlings by using gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) analysis. Small yet detectable amounts of serotonin were identified in root and shoot tissue of solvent-treated Arabidopsis seedlings; however, serotonin levels in plant tissues dramatically increased in seedlings treated with this compound (Fig. 8A). Serotonin is acetylated in the derivatization process by acetic anhydride, producing *N*-acetylserotonin (Fig. 8B). Fig. 8C and D shows mass spectra of the *N*-acetylserotonin standard and the extracted sample, respectively. Representative chromatograms of root and shoot samples from solvent- or serotonin-treated seedlings are shown in Fig. 8E–H. These findings provide the first evidence that serotonin is produced naturally in Arabidopsis, and that plants are able to take up serotonin from the growth medium.

Serotonin inhibits auxin-inducible gene expression

We next investigated whether serotonin acts in an auxin-related signaling pathway by analyzing the expression of the auxin-inducible *DR5:uidA* and *BA3:uidA* gene markers. Since low serotonin concentrations activate LR development by inducing LRP outgrowth (Figs. 2, 5), we first determined histochemical GUS expression during LRP development in 7 d transgenic *DR5:uidA* Arabidopsis seedlings, in response to the solvent or 150 μ M serotonin. Interestingly, serotonin clearly

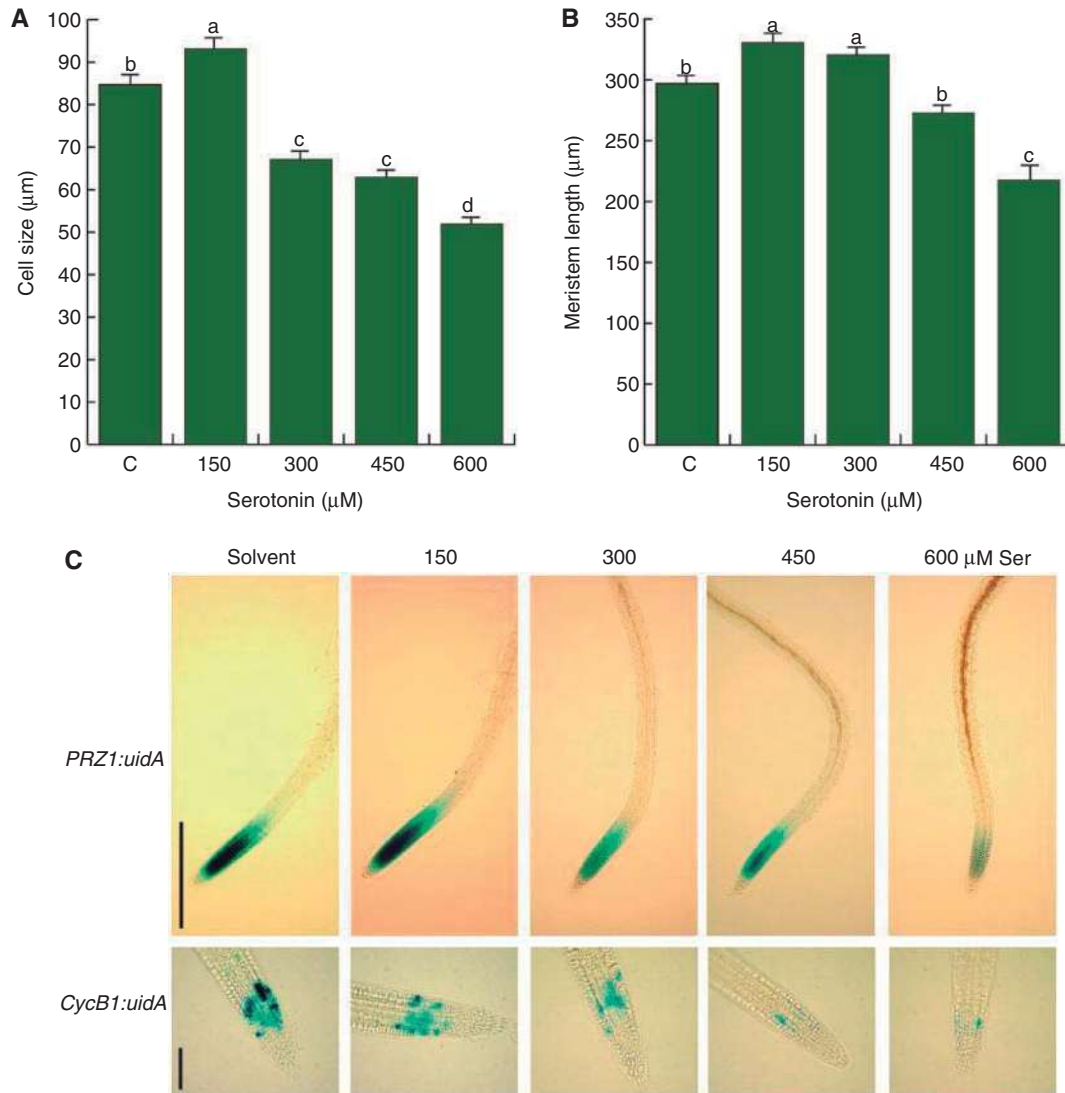


Fig. 4 Effect of serotonin on cell division and elongation. WT (Col-0), *pPRZ1:uidA* and *CycB1:uidA* *A. thaliana* seedlings were grown for 7 d on 0.2 × MS medium supplemented with the indicated concentrations of serotonin. (A) Mean epidermal cell length. (B) Meristem length. Data points represent the mean ± SD ($n = 30$). (C) Plants were stained for GUS activity and cleared to show gene expression. Photographs show representative individuals from at least 15 stained plants. The experiment was replicated twice with similar results. Different letters indicate statistical differences at $P < 0.05$. Scale bars in *pPRZ1:uidA* images = 500 μm, and in *CycB1:uidA* images = 50 μm.

inhibited *DR5:uidA* expression in LRPs from all tested developmental stages (Fig. 9A). We also tested the response of the markers to a high serotonin concentration by analyzing histochemical staining of transgenic *DR5:uidA* and *BA3:uidA* Arabidopsis seedlings that were grown for 7 d in 0.2 × agar-MS medium and then transferred to liquid 0.2 × MS medium supplemented with the solvent, 5 μM IAA or 450 μM serotonin, and incubated for 9 h at 22°C. As previously reported (Ulmasov et al. 1997), in solvent-treated *DR5:uidA* seedlings, GUS expression was absent from cotyledons and leaves and was expressed primarily in the root tip region (Fig. 9B). *DR5:uidA* seedlings grown under a concentration of 5 μM IAA showed strong GUS

activity throughout the plant (Fig. 9B). The pattern of GUS expression in *DR5:uidA* seedlings treated with 450 μM serotonin further decreased when compared with solvent-treated plants (Fig. 9B), indicating the lack of auxin activity for this compound. Untreated *BA3:uidA* seedlings did not show detectable levels of GUS activity (Fig. 9C), whereas, when treated with 5 μM IAA, they showed GUS expression mainly in the petioles of the cotyledons (Fig. 9C) and in the root elongation zone (Fig. 9C). GUS expression in seedlings treated with serotonin was undetectable (Fig. 9C), indicating that this compound failed to activate *BA3:uidA* expression. We also analyzed *DR5:uidA* expression in developing adventitious roots from

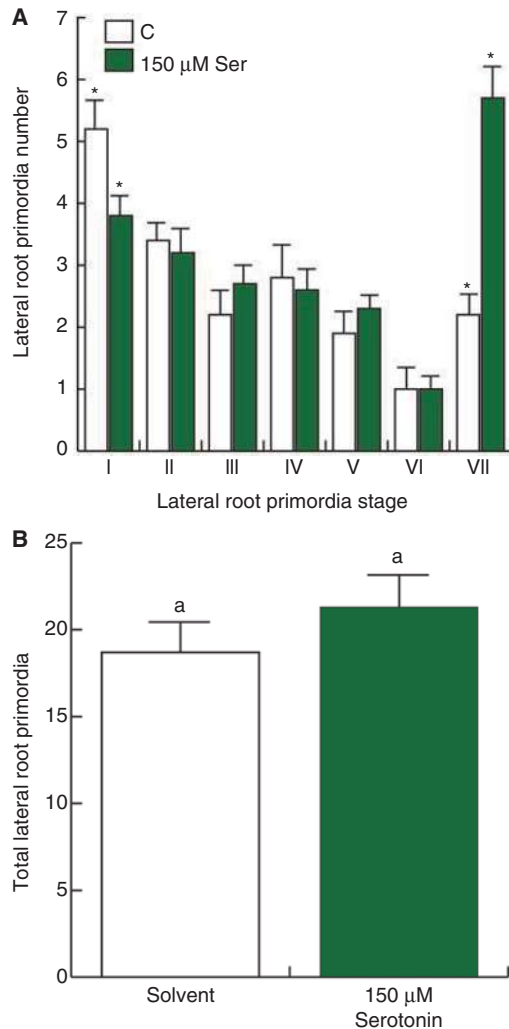


Fig. 5 Effects of serotonin on lateral root primordia development. Arabidopsis Col-0 seedlings were grown for 7 d on agar plates supplemented with the solvent or with 150 μ M serotonin. Data are presented for LRP developmental stages (A) and total LRPs per seedling (B). LRP stages were recorded according to Malamy and Benfey (1997a). Values shown represent the mean of 15 seedlings $\pm$ SD. Different letters are used to indicate means that differ significantly ($P < 0.05$). The experiment was repeated twice with similar results.

Arabidopsis seedlings treated with 150–600 μ M serotonin (Supplementary Fig. S2). A dose–response inhibitory effect on GUS expression was clearly observed, indicating that serotonin did not stimulate but rather repressed auxin-inducible gene expression.

To determine in more detail the possible mechanism of action of serotonin, we performed competence assays by using the auxin-inducible *DR5:uidA* and *BA3:uidA* gene markers. Transgenic Arabidopsis seedlings expressing each of these markers were grown for 7 d in 0.2 $\times$ agar–MS medium and then transferred to liquid 0.2 $\times$ MS medium supplemented

with the solvent, 1 μ M IAA or naphthaleneacetic acid (NAA), 450 μ M serotonin or each auxin in combination with serotonin. When serotonin and IAA were supplied together, a marked reduction of auxin-induced *DR5:uidA* and *BA3:uidA* expression was evident (Fig. 10A). Serotonin also antagonized the effects of NAA on auxin-inducible gene expression when supplied at 450 μ M (Fig. 10B) or under a lower concentration, namely 150 μ M (Supplementary Fig. S3). These results suggest that serotonin may act as a competitive inhibitor of auxin-regulated gene expression in Arabidopsis.

Serotonin did not antagonize auxin-mediated Aux/IAA protein degradation

Auxin promotes the degradation of Aux/IAA repressor proteins via the ubiquitin–proteasome pathway and thereby induces primary auxin-responsive gene expression (Gray et al. 2001). To address the effect of serotonin on auxin-mediated degradation of Aux/IAA proteins, we examined the effect of IAA and serotonin on Aux/IAA stability using the Arabidopsis *HS::AXR3NT-GUS* line, in which a translational fusion between domains I and II of AXR3 and the GUS reporter protein is expressed under the control of a heat shock promoter (Gray et al. 2001). Seedlings expressing the *HS::AXR3NT-GUS* construct were heat shocked at 37°C for 2 h and further treated with 5 μ M IAA, 450 μ M serotonin or 5 μ M IAA plus 450 μ M serotonin for 10, 30 and 60 min. Treatment with IAA showed enhanced degradation of the fusion protein in cotyledons and in the primary root, but serotonin failed to induce degradation of the fusion protein even after 60 min of treatment (Fig. 11A–L). Moreover, this compound stabilized the expression of this marker in cotyledons (compare Fig. 11A–C with I–K), indicating auxin antagonist activity. When both compounds were supplied together, the effect of IAA predominates, giving rise to a GUS expression pattern similar to that observed in Arabidopsis seedlings treated with IAA alone (Fig. 11M–P). Our data indicate that serotonin acts independently of auxin or downstream of auxin receptors, which modulate the degradation of the AXR3 protein.

Effects of serotonin on auxin-induced lateral root formation

Because serotonin strongly inhibited the expression of the auxin-inducible *DR5:uidA* and *BA3:uidA* gene markers, it was possible that the repressing effects of this compound on root hair and LR development could be due to serotonin acting as an auxin inhibitor. We next evaluated the LR responses of WT (Col-0) seedlings to serotonin and NAA by growing Arabidopsis WT (Col-0) seedlings on Petri plates containing 0.2 $\times$ agar–MS medium supplemented with different concentrations of serotonin, NAA or NAA plus serotonin. Seven days after germination, primary root length and LR number were quantified. In these experiments, serotonin concentrations of 150 μ M did not affect primary root growth (Fig. 12A), but significantly increased LR number (Fig. 12B). NAA treatment or NAA plus

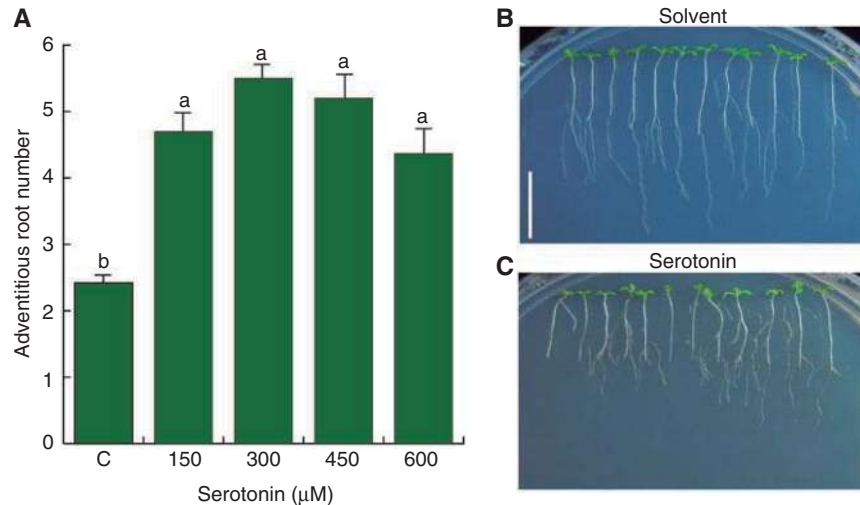


Fig. 6 Effects of serotonin on adventitious root development from Arabidopsis shoot explants. Arabidopsis seedlings were germinated and grown in darkness for 5 d on the surface of agar plates containing 0.2× MS medium and hypocotyl explants were obtained. Hypocotyl explants were transferred to 0.2× MS medium containing the indicated concentrations of the compound and cultivated for a further 9 d period to quantify adventitious root formation. (A) Adventitious root number in response to serotonin treatments. (B) Representative photograph of solvent-treated Arabidopsis (Col-0) explants. (C) Photograph of explants supplied with 450 μM serotonin. Values shown in (A) represent the mean ± SD ($n = 20$). Different letters indicate statistical differences at $P < 0.05$. The experiment was repeated twice with similar results. Scale bar = 1 cm.

150 μM serotonin showed a strong effect of induced root branching. Interestingly, serotonin specifically induced LR growth when supplied together with NAA, indicating that it alleviates the growth-repressing effects of NAA on LR elongation (Fig. 12C, D). Supply of 300 and 450 μM serotonin inhibited both primary root growth and LR formation. In contrast, concentrations of 0.1 and 0.2 μM NAA, which inhibit primary root growth, strongly stimulated LR formation (Supplementary Fig. S4). Although treatment of seedlings with both serotonin and NAA showed an additive effect on primary root growth inhibition, we found that serotonin had an antagonistic effect on LR response to NAA by decreasing LR formation (Supplementary Fig. S4). These results imply that although the effects of serotonin and NAA on primary root growth are similar, they act in an opposite fashion to regulate LR development.

Effect of serotonin on root architectural traits in auxin-related Arabidopsis mutants

To evaluate at the genetic level the role played by selected auxin-related loci in serotonin responses, we compared the primary root growth and adventitious root formation of WT (Col-0) seedlings and the *axr2-1*, *axr4-1*, *aux1-7* and *axr1-3* Arabidopsis mutants in response to 150 μM serotonin treatment. Serotonin significantly induced both LR number and density in WT and in *axr2-1*, *axr4-1* and *aux1-7* seedlings but not in *axr1-3* mutants (Fig. 13A–C). Surprisingly, the *axr2-1* mutants showed increased LR numbers when grown in medium without serotonin, indicating that this mutant is

inherently potentiated in LR formation (Fig. 13B, C). We also tested the effects of a high serotonin concentration on adventitious root development in intact Arabidopsis seedlings. Supply of 450 μM serotonin caused an 80% inhibition in primary root growth in WT seedlings compared with solvent-treated control seedlings. All four auxin-resistant mutants *aux1-7*, *axr1-3*, *axr2-1* and *axr4-1* showed similarly inhibited primary root growth to WT plants (Supplementary Fig. S5). When grown in medium without serotonin, WT and mutant seedlings showed an absence of adventitious roots, whereas when treated with the compound the formation of 3–6 adventitious roots was observed. This effect was similar in WT seedlings and in *axr4-1* and *aux1-7* mutants (Supplementary Fig. S5). In contrast, *axr2-1* mutants showed exacerbated responses to the compound while *axr1-3* mutants showed decreased adventitious root numbers (Supplementary Fig. S5). Supplementary Fig. S6 illustrates the root architectural responses of Arabidopsis seedlings to IAA treatments; the primary root growth resistance of the lines used in this study with an almost normal adventitious root induction except in *axr1-3* can be seen. Our results indicate that LR and adventitious root induction by serotonin are independent of the *axr2-1*, *axr4-1* and *aux1-7* loci but require an intact *axr1-3* locus.

Discussion

Serotonin is a highly conserved indolic compound occurring in evolutionarily distinct organisms from humans to plants. The results of research with serotonin have uncovered several facts:

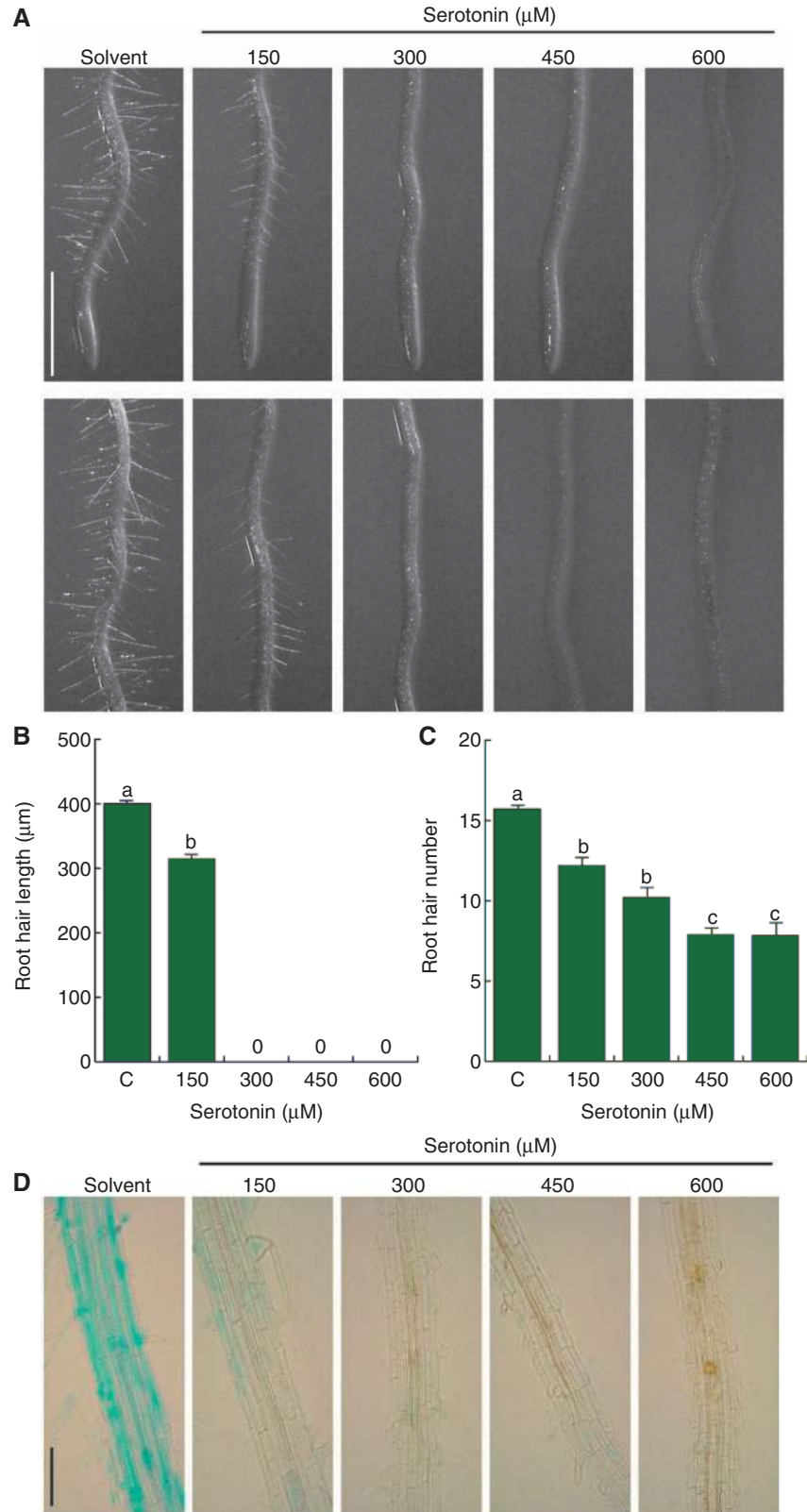


Fig. 7 Effects of serotonin on root hair development. *Arabidopsis thaliana* seedlings were grown for 5 d on $0.2\times$ MS medium supplemented with the indicated concentrations of serotonin. (A) Representative photographs of root hairs formed at the differentiation and maturation regions of

(i) it is present in a wide number of plant species; (ii) it is produced from tryptophan; and (iii) its concentration may vary in plant tissues or in response to environmental conditions, suggesting important developmental and adaptive functions (Ishihara et al. 2008, Kang et al. 2009a). However, little is known about its signaling role in the plant. In a previous study by Kang et al. (2009a), it was found that serotonin is greatly accumulated in rice (*O. sativa*) leaves undergoing senescence induced by either nutrient deprivation or detachment, and its synthesis is closely coupled with transcriptional and enzymatic induction of the tryptophan biosynthetic genes as well as TDC. Transgenic rice plants that overexpressed TDC accumulated higher levels of serotonin than the WT and showed delayed senescence of rice leaves. In contrast, transgenic rice plants, in which expression of TDC was suppressed through an RNAi system, produced less serotonin and senesced faster than the WT, suggesting that serotonin is involved in attenuating leaf senescence.

Since the role of serotonin in plant development is not well understood, in this work we tested the hypothesis that it could act as a plant growth regulator by probably acting as an auxin or interfering with auxin action. Pharmacological tools that have increased our understanding of auxin signaling are auxin response inhibitors, which belong to two main classes: those that alter auxin transport and those that perturb auxin signaling. Most studies have employed synthetic inhibitors, such as 1-naphthylphthalamic acid (NPA), *p*-chlorophenoxyisobutyric acid (PCIB) and triiodobenzoic acid (TIBA), or small molecule antagonists of the TIR1 receptor function produced by introducing different alkyl chains to the α -position of IAA (Fujita and Syono 1996, Casimiro et al. 2001, Oono et al. 2003, Hayashi et al. 2008). While synthetic auxin inhibitors have provided important information about the molecular mechanisms involved in auxin action, the in planta role of these unnatural compounds is questionable. More recently, naturally occurring tryptophan derivatives such as tryptophan conjugates of jasmonic acid and IAA have been found to interfere with a broad range of auxin-mediated processes (Staswick 2009). Our results show that serotonin may also act as an endogenous auxin inhibitor. We used the Arabidopsis root system to test the effects of exogenously supplied serotonin on several morphogenetic processes including primary root growth, LR formation, adventitious root formation and root hair development, most of which are auxin-regulated processes. We found that serotonin stimulated LR development at concentrations of 10–160 μ M by inducing LRP maturation (Figs. 2, 5). This effect correlated with decreased expression of the auxin response marker *DR5:uidA* in LRPs (Fig. 9A). These results suggest that under normal growth

conditions, auxin synthesis/response in developing LRPs is supraoptimal for LR growth. Serotonin might thus increase LRP maturation by antagonizing auxin signaling in LRPs. However, it also repressed LR formation and root hair growth at higher concentrations but increased adventitious root formation from intact plants and from shoot explants (Fig. 6, 7; Supplementary Fig. S1). The activity of serotonin in modulating root growth was lower than that observed for auxins. Fig. 2 shows that this compound only modestly slowed root growth. Even at 300 μ M, primary root growth inhibition was <50% of the control value. By comparison, under similar growth conditions and using the same growth medium, IAA or auxin-related signals produced 50% inhibition at concentrations of at least two orders of magnitude lower than this (Contreras-Cornejo et al. 2009). Intriguingly, another animal neurotransmitter, glutamate, exerted a 60% primary root growth inhibition in WT Arabidopsis (Col-0) seedlings at a 500 μ M concentration (Walch-Liu et al. 2006). Similarly to glutamate, serotonin did not interfere with LR initiation but potentiated LR outgrowth. An important difference in the mode of action of serotonin compared with glutamate is the role played by auxin signaling in plant responses to these signals. Two loss-of-function mutants at the *AXR1* locus (*axr1-3* and *axr1-12*) were hypersensitive to glutamate in primary root growth inhibition, whereas *aux1-7* was resistant, indicating that auxin transport and signaling might be important for root responses to glutamate (Walch-Liu et al. 2006). In contrast, primary root growth in both *axr1-3* and *aux1-7* was inhibited similarly to that in WT seedlings when treated with 450 μ M serotonin (Supplementary Fig. S5).

The effects of serotonin on inhibiting primary root growth and repressing LR formation are similar to those caused by auxin influx or efflux inhibitors such as TIBA and NPA (Fujita and Syono 1996, Casimiro et al. 2001). Serotonin effects also resemble those caused by application of yokonolide B, an inhibitor of auxin action isolated from *Streptomyces diastatochromogenes*, which stimulated LR formation at low concentrations, whereas at higher concentrations it promoted adventitious root development (Hayashi et al. 2003). Although serotonin was detected at low levels in roots and shoots of solvent-treated Arabidopsis seedlings (Fig. 8), it may still play a significant role since it increases in concentration under particular developmental transitions and in response to pathogen attack (Ishihara et al. 2008, Kang et al. 2009a). Auxin is very important for root architecture remodeling and it is highly regulated by a complex network of interacting mechanisms; therefore, serotonin as an endogenous auxin inhibitor might be expected to remain low in most tissues under conditions of normal growth.

the primary root of 5-day-old Arabidopsis seedlings grown on the surface of agar plates supplemented with the indicated concentrations of serotonin. (B and C) Data points indicate the mean $\pm$ SD for root hair length (B) or root hair number (C) of 10 epidermal cells located in a fully differentiated zone of the primary root from 20 seedlings analyzed. (D) *AtExp7:uidA* expression in response to serotonin treatments. These experiments were repeated twice with similar results. Different letters indicate statistical differences at $P < 0.05$. Scale bars in (A) = 500 μ m and in (D) = 100 μ m.

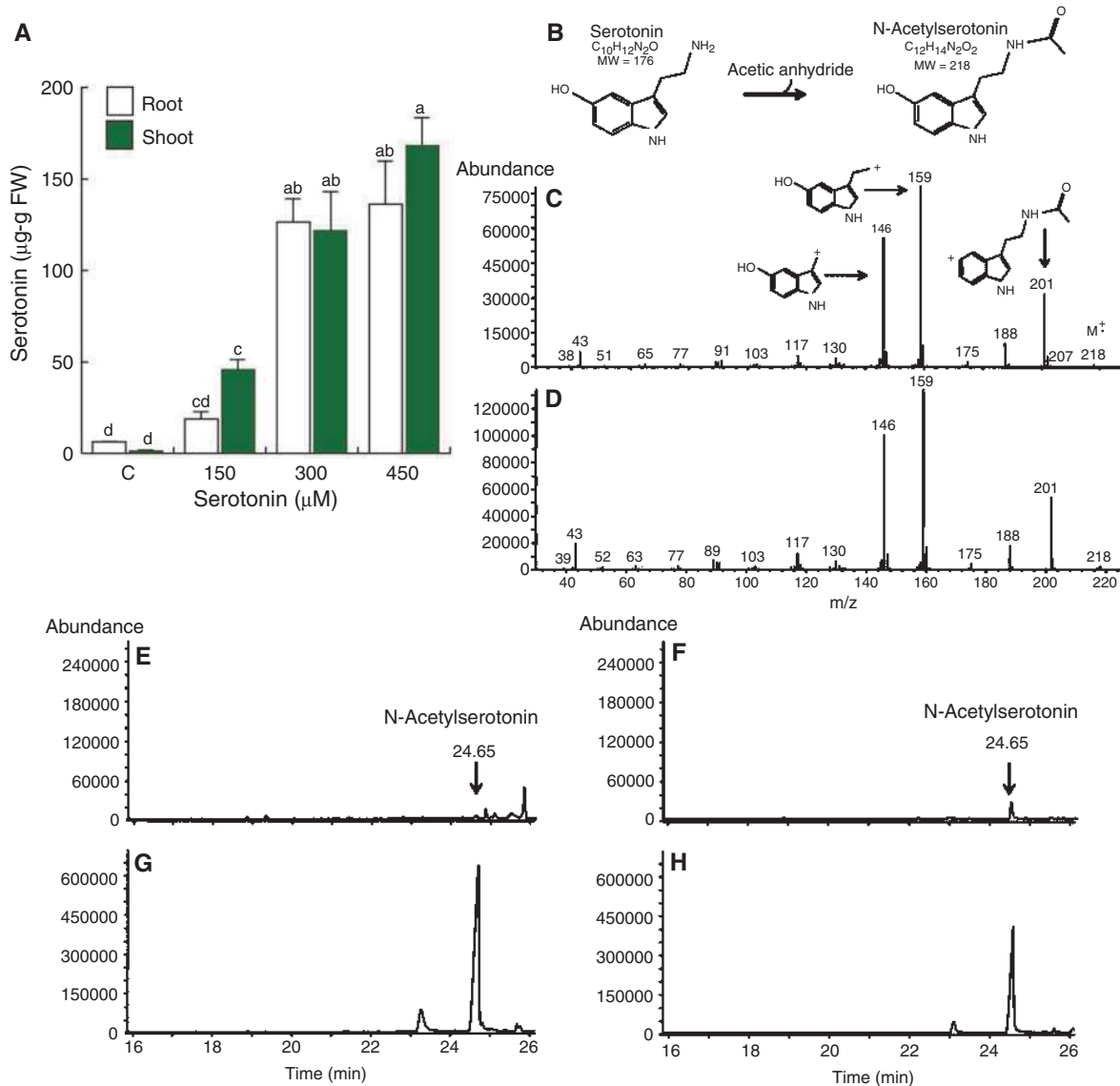


Fig. 8 Determination of serotonin from control or serotonin-treated Arabidopsis seedlings by GC-MS. Arabidopsis WT seedlings were germinated and grown for 22 d in 0.2× MS medium supplemented with the solvent or with increased concentrations of serotonin. (A) Serotonin quantification in root and shoot. (B) Acetylation reaction of serotonin with acetic anhydride. (C) The 70 eV electron impact full scan mass spectra from *m/z* 50 to 500 of the *N*-acetylserotonin standard. (D) *N*-Acetylserotonin in a plant extract. (E) Total ion chromatogram of *N*-acetylserotonin from solvent-treated shoots or roots (F), or from shoot and roots of plants treated with 450 μM serotonin, respectively (G–H).

Interestingly, supplementation of serotonin in the growth medium dramatically increased serotonin concentrations in both root and shoot tissues, indicating that Arabidopsis seedlings are able to take up serotonin from the medium and transport it within different plant tissues (Fig. 8).

To test whether serotonin may act on auxin transport or signaling, we examined the effect of serotonin on *DR5::uidA* and *BA3::uidA* gene expression induced by auxins with different transport properties. IAA is a substrate for auxin influx carriers, while NAA freely diffuses through membranes (Delbarre et al. 1996, Marchant et al. 1999). Serotonin similarly antagonized

auxin-inducible gene expression revealed by both marker lines in response to both IAA and NAA (Figs. 9, 10), suggesting that serotonin does not perturb auxin transport.

Auxin alters the stability of AUX/IAA repressors, and therefore serotonin may act by blocking AUX/IAA protein degradation, thus explaining the inhibitory effects of this compound on *DR5::uidA* and *BA3::uidA* gene expression. To test this possibility, we analyzed the effects of serotonin on auxin-induced degradation of an AUX/IAA protein. The Arabidopsis *HS::AXR3NT-GUS* transgenic line strongly expresses an IAA17/AXR3 translational fusion protein under control of a heat shock

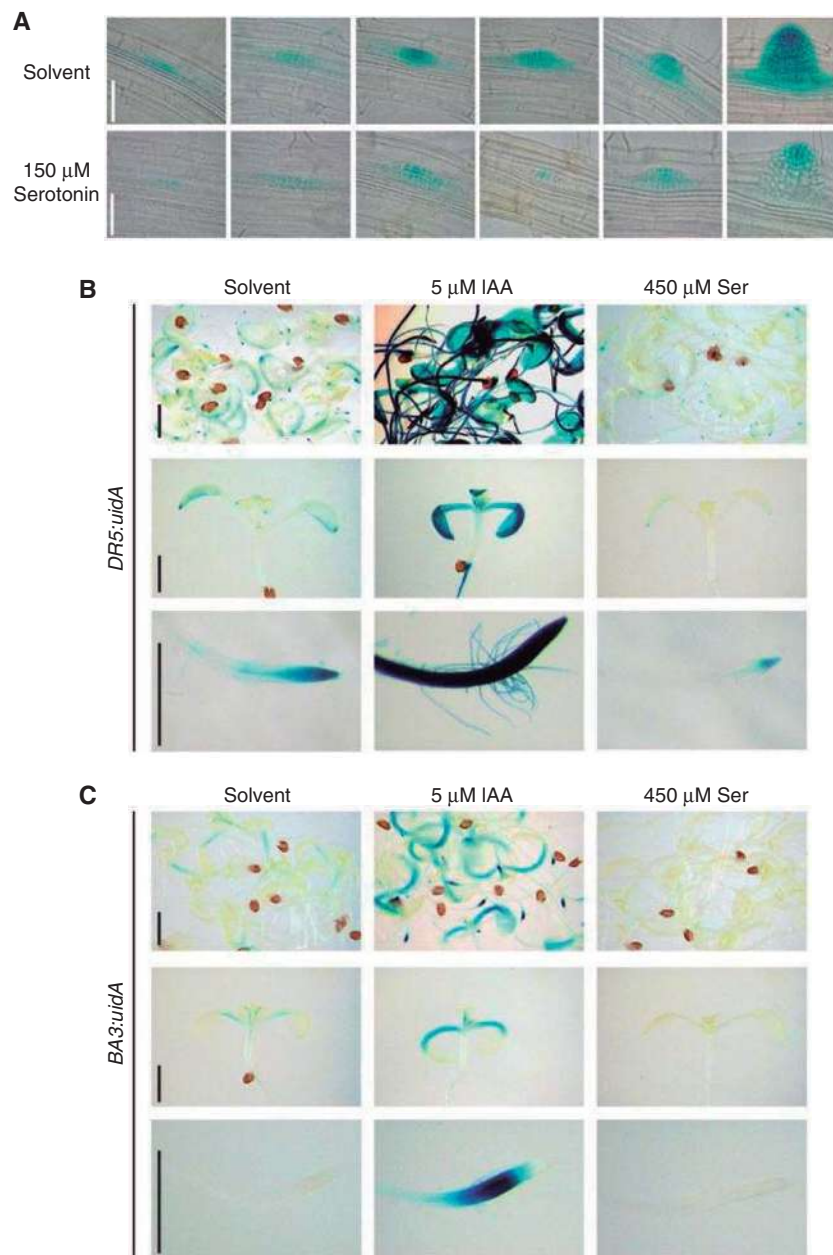


Fig. 9 Effect of serotonin on auxin-regulated gene expression. Twelve hour GUS staining of *DR5:uidA* or *BA3:uidA* Arabidopsis seedlings grown for 7 d on agar plates containing 0.2× MS medium or medium supplemented with IAA or serotonin. (A) *DR5:uidA* expression in lateral root primordia. Comparative effect of IAA and serotonin on *DR5:uidA* (B) and *BA3:uidA* expression (C) Notice the decrease in GUS expression in LRPs, shoots and roots in the treatments with serotonin. Photographs are representative individuals of at least 20 stained seedlings. The experiment was repeated twice with similar results. Scale bars in (A) = 50 μm and in (B, C) = 500 μm.

promoter (Gray *et al.* 2001). The degradation rate of the AUX/IAA fusion protein is rapid and was enhanced by IAA treatment (Fig. 11). In contrast, serotonin failed to induce degradation of the fusion protein, indicative of the lack of an auxin activity.

5 When IAA and serotonin are supplemented together, the degradation rate of the AUX/IAA fusion protein is rapid and resembles the effects of applying IAA alone (Fig. 11). These data

suggest that serotonin may not compete for auxin binding to its receptors or that it acts downstream of auxin receptors, which modulate the degradation of the AXR3 protein.

Serotonin did not suppress the inhibition of primary root growth caused by IAA or NAA treatment (Fig. 12, Supplementary Fig. S4). However, it stimulates LR growth at low concentrations in the absence of exogenous auxin and

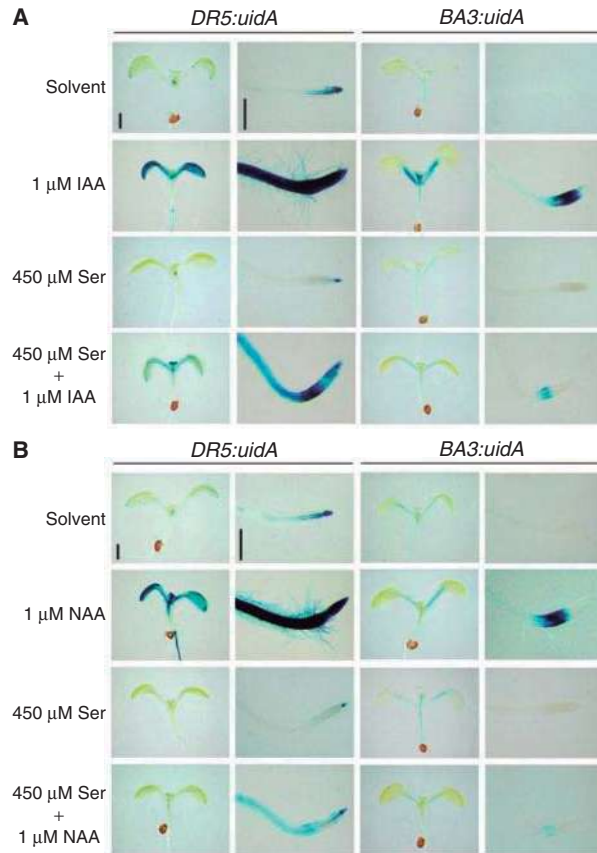


Fig. 10 Serotonin antagonizes the auxin-inducible expression modulated by IAA or NAA treatment. Twelve hour GUS staining of *DR5::uidA* and *BA3::uidA* Arabidopsis seedlings grown for 7 d on agar plates containing 0.2× agar-MS medium and then transferred to 0.2× MS liquid medium supplemented with auxins, with serotonin or both. Note the decrease in GUS expression in shoots and roots in both IAA (A) and NAA (B) treatments by serotonin. Photographs are representative individuals of at least 20 stained seedlings. The experiment was repeated twice with similar results. Scale bars = 250 μm.

exacerbates the effects of NAA by inducing growth of LR (Fig. 12C, D). High serotonin concentrations (i.e. 450 μM) blocked the stimulation of lateral rooting in response to exogenous auxin (Supplementary Fig. S4). Auxin antagonists vary significantly in how they affect root architecture. For example, terfostat A and a synthetic auxin inhibitor having an alkyl substitution at the α-position of IAA stimulated primary root growth, which was attributed to the inhibition of endogenous auxin (Yamazoe et al. 2005, Hayashi et al. 2008). In contrast, both PCIB and yokonolide B suppressed primary root growth, and this was dependent on TIR1 and AUX/IAA7, suggesting it was not a toxic effect (Hayashi et al. 2003, Oono et al. 2003). By using transgenic Arabidopsis seedlings expressing *AtHistH2B::YFP* (yellow fluorescent protein) and vital staining with propidium iodide, we determined that the primary root growth inhibitory effect of serotonin was not due to toxicity, as

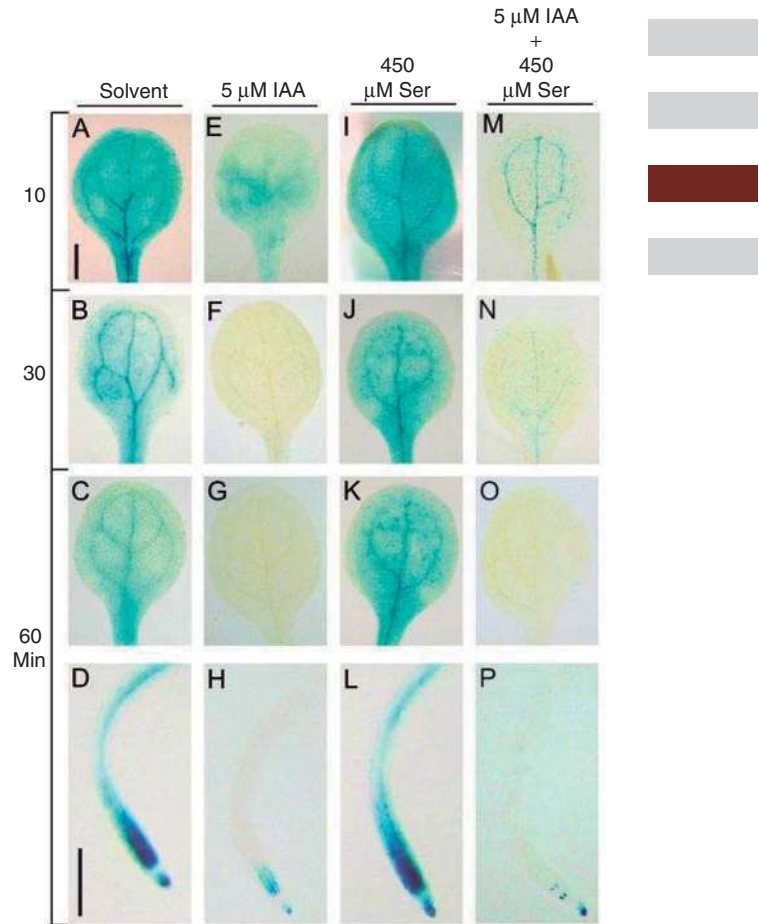


Fig. 11 Analysis of AUX/IAA stability with a *HS::AXR3NT-GUS* fusion. Transgenic seedlings expressing the *HS::AXR3NT-GUS* constructs were heat shocked at 37°C for 2 h. After heat induction, the seedlings were treated with IAA, serotonin or IAA plus serotonin for different times at the indicated concentrations, and stained overnight for GUS activity. Representative photographs of cotyledons from at least 20 stained seedlings are shown. Similar results were obtained in two independent experiments. Scale bars = 250 μm.

serotonin-treated seedlings did not show meristem cell damage (Supplementary Fig. S7). Instead, it could be due to serotonin modulating cell division and elongation (Fig. 4).

Several auxin-resistant Arabidopsis mutants such as *axr1* and *aux1-7*, which are defective in auxin signaling and transport, respectively, exhibit fewer LR and reduced root hair formation. Since similar phenotypes were observed in WT Arabidopsis (Col-0) roots treated with serotonin, it is possible that high levels of serotonin in the plant impair the cellular auxin response and thereby inhibit the initiation of LR and root hairs. To determine whether auxin-related mutants were also resistant to serotonin, we tested the effects of this compound on LR development, primary root growth inhibition and adventitious root formation in WT Arabidopsis seedlings and in *axr2-1*, *axr4-1*, *aux1-7* and *axr1-3* auxin-related mutants. We

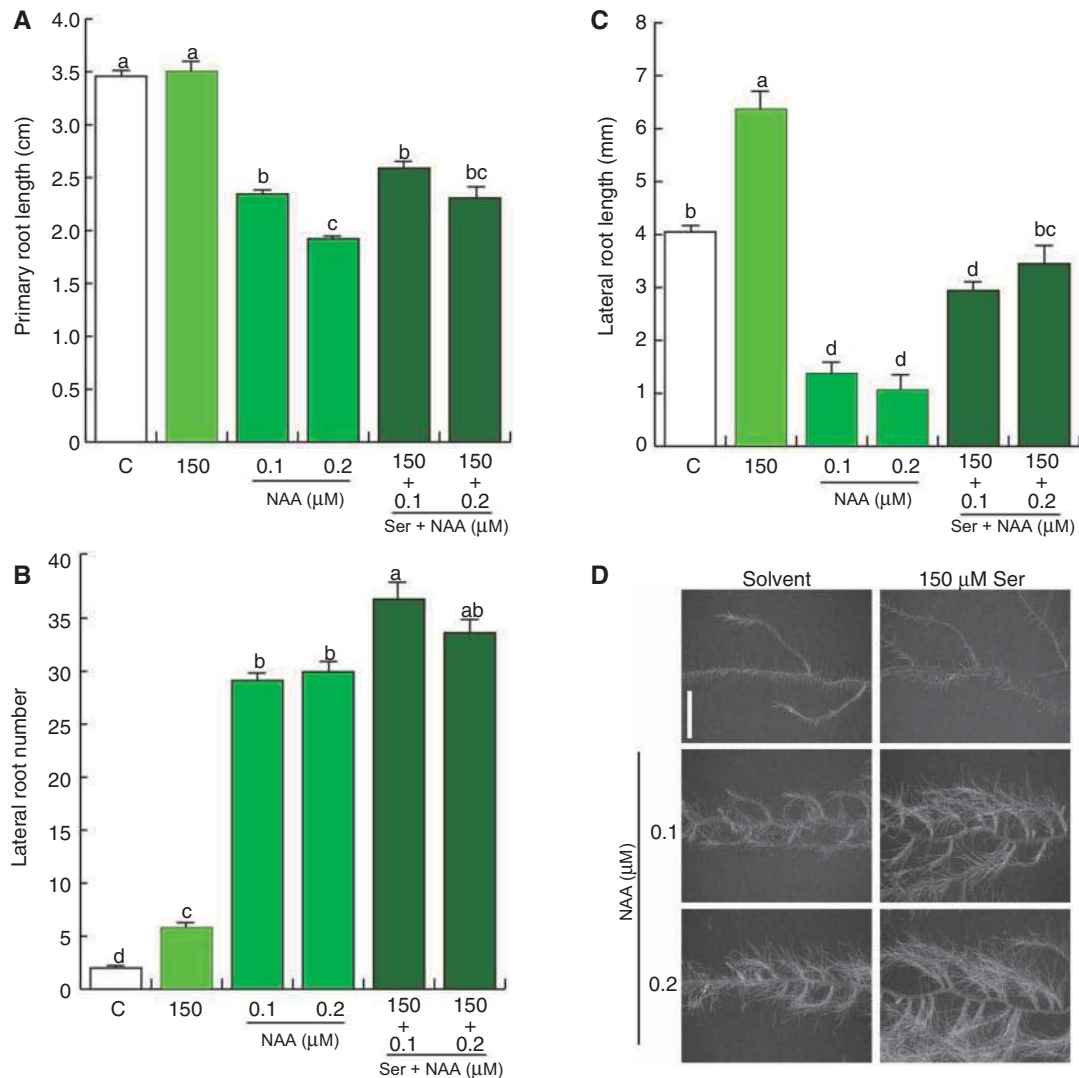


Fig. 12 Serotonin induces lateral growth in combination with auxin. Arabidopsis (Col-0) seedlings were germinated and grown for 7 d on agar solidified $0.2\times$ MS medium supplemented with NAA, 150 μ M serotonin or both compounds in combination. (A) Primary root length. (B) Lateral root number per plant. (C) Lateral root length. (D) Representative photographs of lateral roots grown in the indicated treatments. Data points indicate the mean $\pm$ SD from 20 seedlings analyzed. Different letters indicate statistical differences at $P < 0.05$. The experiments were repeated twice with similar results. Scale bar = 1 mm.

found that 150 μ M serotonin significantly increased LR number and density in WT, *axr2-1*, *axr4-1* and *aux1-7*, but not in *axr1-3* (Fig. 13B, C). Surprisingly, the dominant *axr2-1* mutant, with a gain of function in *IAA7/AXR2*, caused increased LR formation both under normal growth conditions and in response to serotonin. This result suggests that *IAA7/AXR2* plays a positive role in LR development, in agreement with previously published information (Nagpal et al. 2000). The lack of response of *axr1-3* to serotonin indicates that this compound requires an intact AXR1 protein to activate LR development. Treatment with 450 μ M serotonin also showed exacerbated adventitious root production in *axr2-1* and decreased adventitious root response in *axr1-3* when compared with WT plants

(Supplementary Fig. S5). Although the exact mechanism of action of serotonin is still unclear, several lines of evidence indicate that serotonin probably acts as a natural auxin inhibitor. (i) Serotonin is present in Arabidopsis tissues at low concentrations. (ii) Serotonin treatment stimulates LRP maturation by decreasing auxin responses during LRP development. (iii) Exogenous application of serotonin inhibited root developmental processes which are under auxin control, such as primary root growth, LR formation and root hair development. (iv) Serotonin blocked auxin-responsive *DR5:uidA* and *BA3:uidA* gene expression and auxin-regulated LR formation. (v) Mutant analyses indicate that serotonin inhibits primary root growth and promotes adventitious root formation

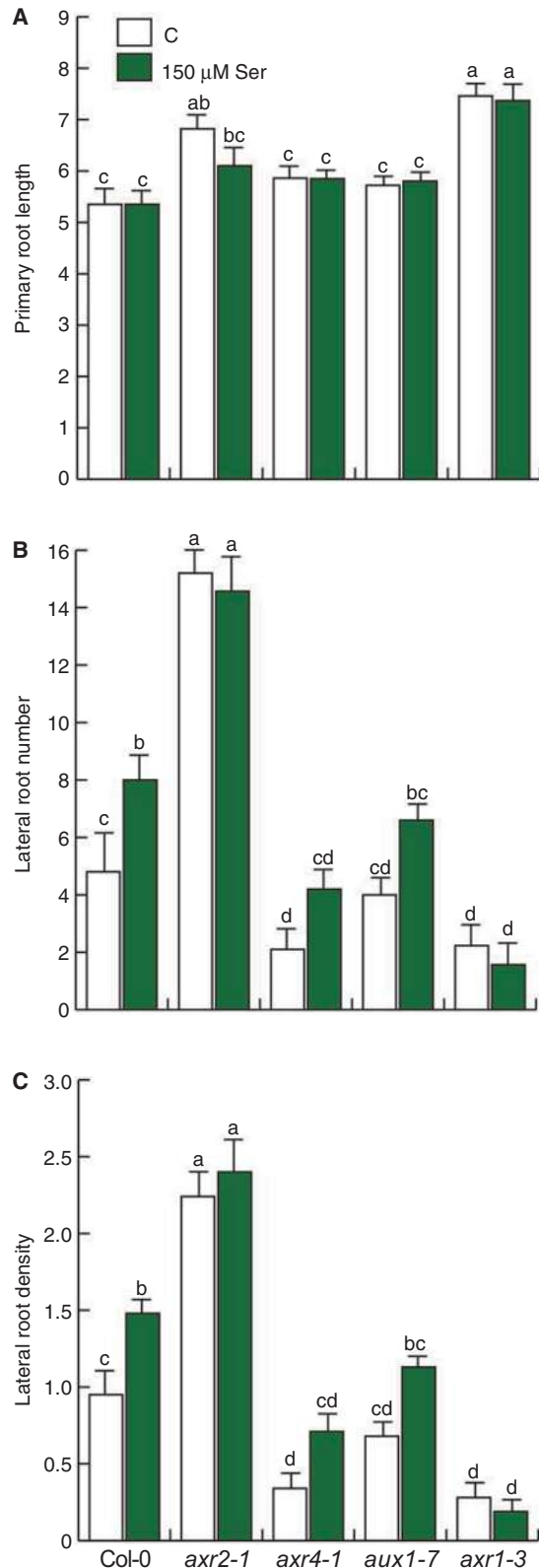


Fig. 13 Effects of serotonin on primary root growth and lateral root formation in WT Arabidopsis (Col-0) seedlings and auxin-related mutants. Arabidopsis WT and mutant seedlings were germinated and

independently of at least three auxin-related loci, namely *axr2-1*, *axr4-1* and *aux1-7*.

Plant neurobiology has recently emerged as an integrated view of plant signaling. Plants process the information from a changing environment to develop and reproduce. Communication between cells and tissues is essential for plant fitness, which involves an integrated signaling system that includes long-distance electrical signals, vesicle-mediated transport of IAA and production of chemicals known to be neuronal in animals (Baluska et al. 2005, Brenner et al. 2006). Among the animal neurotransmitters, acetylcholine, catecholamines, histamine, serotonin, dopamine, melatonin and glutamate are the most common in the animal nervous system, playing roles in information processing and development. It is of interest that each of these compounds is present in plants. Similarly to IAA, serotonin and melatonin are tryptophan derivatives. Interestingly, IAA, which is transported from cell to cell has some characteristics reminiscent of neurotransmitters, such as a poorly understood vesicle-based process that involves IAA transporters and recycling between the plasma membrane and endosomes (Geldner et al. 2003, Schlicht et al. 2006). Our results showing that serotonin regulates root architecture in a similar way to another neurotransmitter, glutamate, and that these compound can also affect auxin-mediated responses in Arabidopsis are in agreement with the proposed role of IAA in the plant neurobiological perspective. The possible roles played by other neurotransmitter signals in plant processes may be further clarified by using the molecular tools available in *A. thaliana* and other model plants.

Materials and Methods

Plant material and growth conditions

Arabidopsis (*A. thaliana* Col-0), the transgenic Arabidopsis lines *HS::AXR3NT-GUS* (Gray et al. 2001), *DR5:uidA* (Ulmasov et al. 1997), *BA3:uidA* (Oono et al. 1998), *pPRZ1:uidA* (Sieberer et al. 2003) and *CyCB1:uidA* (Colón-Carmona et al. 1999), histone *H2B::YFP* (Biosnard-Lorig et al. 2001), and the mutant lines *axr1-3* (Lincoln et al. 1990), *aux1-7* (Pickett et al. 1990), *axr2-1* (Timpote et al. 1994) and *axr4-1* (Hobbie and Estelle 1995) were used for the different experiments. Seeds were surface sterilized with 95% (v/v) ethanol for 5 min and with 20% (v/v) bleach for 7 min. After five washes in distilled water, seeds were germinated and grown on agar plates containing 0.2× MS medium. The MS medium (Murashige and Skoog Basal Salts Mixture, catalog no. M5524) was purchased from Sigma. Phytagar

grown for 12 d in 0.2× MS medium supplemented with the solvent or 150 μM serotonin. (A) Primary root length. (B) Lateral root number per seedling. (C) Lateral root density. Values shown represent the means of 30 seedlings ± SD. The experiment was repeated three times with similar results.

(commercial grade) was purchased from Gibco-BRL. Plates were placed vertically at an angle of 65° to allow root growth along the agar surface and to allow unimpeded aerial growth of the hypocotyls. Plants were placed in a plant growth chamber (Percival AR-95L) with a photoperiod of 16 h light/8 h darkness, light intensity of 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and temperature of 22°C.

Analysis of growth

Growth of primary roots was registered using a ruler. LR numbers were determined by counting the LRs present in the primary root, from the tip to the root/stem transition. LR densities were determined by dividing the LR number by the primary root length and expressed as LRP cm^{-1} . Root hairs were measured in a 500 μm region from the primary root tip. The average length of root hairs was determined by measuring 100 hairs for each root, taking as a reference the root protoxylematic plane to locate the radical hair base in the epidermal cell.

Determination of developmental stages of LRP

LRPs were quantified 7 d after germination. Seedling roots were first cleared to enable LRP at early stages of development to be visualized and counted. Each LRP was classified according to its stage of development as reported by Malamy and Benfey (1997). The developmental stages are as follows, Stage I: LRP initiation. In the longitudinal plane, approximately 8–10 'short' pericycle cells are formed. Stage II: the LRP is divided into two layers by a periclinal division. Stage III: the outer layer of the primordium divides periclinally, generating a three-layer primordium. Stage IV: an LRP with four cell layers. Stage V: the LRP is midway through the parent cortex. Stage VI: the LRP has passed through the parent cortex layer and has penetrated the epidermis. It begins to resemble the mature root tip. Stage VII: the LRP appears to be just about to emerge from the parent root.

Histochemical analysis

For histochemical analysis of GUS activity, Arabidopsis seedlings were stained and incubated overnight at 37°C in a GUS reaction buffer (0.5 mg ml^{-1} 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide in 100 mM sodium phosphate, pH 7). The stained plants were cleared and fixed with 0.24 N HCl in 20% methanol (v/v) and incubated for 60 min at 62°C. The solution was substituted by 7% NaOH (w/v) in 60% ethanol (v/v) for 20 min at room temperature. Plants were dehydrated with ethanol treatments at 40, 20 and 10% (v/v) for a 24 h period each, and fixed in 50% glycerol (v/v). The processed roots were placed on glass slides and sealed with commercial nail varnish. For each marker line and for each treatment, at least 20 transgenic plants were analyzed.

Aux/IAA protein degradation assay

Six-day-old *HS::AXR3NT-GUS* transgenic Arabidopsis seedlings were incubated on 0.2 $\times$ liquid MS medium for 2 h at 37°C, followed by transfer of the seedlings into 0.2 $\times$ liquid MS

medium supplemented with IAA or serotonin or both for 10, 30 or 60 min at 22°C. The seedlings were washed with fresh 0.2 $\times$ MS medium and, 12–14 h later, histochemically stained for GUS activity.

Serotonin determination by GC-MS

The extraction of serotonin from leaves and roots of *A. thaliana* Col-0 (0.1 g) was done with 3 ml of methanol with continuous agitation for 3 h. The extract was evaporated to complete dryness under a stream of nitrogen. Serotonin was acetylated with acetic anhydride (1.5 ml) and 1 ml of dichloromethane, and then sonicated for 15 min and heated at 75°C for 1.5 h. The *N*-acetylserotonin was evaporated under a stream of nitrogen and redissolved in 50 μl of dichloromethane. *N*-Acetylserotonin was analyzed in an Agilent 6850 Series II gas chromatograph equipped with an Agilent MS detector model 5973, and a 30 m $\times$ 0.2 mm $\times$ 0.25 mm, 5% phenyl methyl silicone capillary column (HP-5 MS). Operating conditions used helium as carrier gas, 1 ml min^{-1} ; detector temperature of 300°C and injector temperature of 250°C. The volume of injected sample was 1 μl . The column was held for 3 min at 150°C and programmed at 6°C min^{-1} to a final temperature of 278°C for 5 min. *N*-Acetylserotonin was identified by comparison with a mass spectra library (NIST/EPA/NIH, 'Chem Station' Hewlett Packard). The identity of the *N*-acetylserotonin was further confirmed by the comparison of the retention time in the tissue extract with a sample of the pure serotonin standard (Sigma) derivatized following the same procedure mentioned above. A SIM analysis was used to verify the presence of this compound in the sample. The molecular ions were monitored after electron impact ionization (70 eV). They were *m/z* 218, *m/z* 159 and *m/z* 146. To estimate the amount of compound produced by the plant, we constructed an individual calibration curve for the derivatized standard using concentrations from 0.1 to 30 μg .

Microscopy

The *A. thaliana* root system was analyzed with a stereoscopic microscope (Leica MZ6, Leica Microsystems). Total LRs were counted at 30 $\times$ magnification. Images were captured with a Sony Cyber-shot DSC-S75 digital camera (Sony Electronics Inc.) adapted to the microscope and processed with the Zeiss Axio Vision 4AC software (Carl Zeiss). For confocal microscopy, solvent- or serotonin-treated transgenic Arabidopsis seedlings expressing the histone *H2B::YFP* construct (Boisnard-Lorig et al. 2001) were mounted on microscope slides into a solution of propidium iodide (10 mg ml^{-1}). Primary root meristems were analyzed by imaging mounted samples with an inverted confocal microscope (Zeiss Axiovert 200 LSM). For propidium iodide detection, wavelengths employed were an excitation line of 568 nm with an emission window of 585–610 nm. YFP was excited with 488 nm line and emission detected at 505–550 nm.

Data analysis

Arabidopsis root systems were viewed with an AFX-II-A stereo-microscope (Nikon). All LR's emerging from the primary root and observed under the 30× objective were taken into account for LR number data. For all experiments, the overall data were statistically analyzed in the SPSS 10 program (SPSS). Univariate and multivariate analyses with Tukey's post-hoc test were used for testing differences in growth and root developmental responses in WT and mutant plants. In the figures, different letters are used to indicate means that differ significantly ($P = 0.05$).

Supplementary data

Supplementary data are available at PCP online.

Funding

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología [CONACYT, México, grant No. 80916]; Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología [COECYT, México, grant No. CB0702110-0]; Consejo de la Investigación Científica [UMSNH, México, grant No. CIC 2.26].

Acknowledgments

We gratefully acknowledge Drs. Hyung Taeg Cho, Tom Guilfoyle, Athanasios Theologis, Mark Estelle, Bonnie Bartel, Frederick Berger and Peter Doerner for kindly providing us with seeds of transgenic Arabidopsis and mutant lines. We thank Dr. June Simpson for critical reading of our manuscript, and Nydia Hernández-Ríos for advice with confocal microscopy.

References

- Baluska, F., Volkmann, D. and Menzel, D. (2005) Plant synapses: actin-based domains for cell-to-cell communication. *Trends Plant Sci.* 10: 106–111.
- Boisnard-Lorig, C., Colón-Carmona, A., Bauch, M., Hodge, S., Doerner, P., Bancharel, E. et al. (2001) Dynamic analyses of the expression of the HISTONE::YFP fusion protein in Arabidopsis show that syncytial endosperm is divided in mitotic domains. *Plant Cell* 13: 495–509.
- Brenner, E.D., Stahlberg, R., Mancuso, S., Vivanco, J., Baluska, F. and Van Volkenburgh, E. (2006) Plant neurobiology: an integrated view of plant signaling. *Trends Plant Sci.* 11: 413–419.
- Campos-Cuevas, J.C., Pelagio-Flores, R., Raya-González, J., Méndez-Bravo, A., Ortiz-Castro, R. and López-Bucio, J. (2008) Tissue culture of *Arabidopsis thaliana* explants reveals a stimulatory effect of alkaloids on adventitious root formation and nitric oxide accumulation. *Plant Sci.* 174: 165–173.
- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R.P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R. et al. (2001) Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. *Plant Cell Physiol.* 13: 843–852.
- Casimiro, I., Beekman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P. et al. (2003) Dissecting Arabidopsis lateral root development. *Trends Plant Sci.* 8: 165–171.
- Cho, H.T. and Cosgrove, D.J. (2002) Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 3237–3253.
- Colón-Carmona, A., You, R., Haimovitch-Gal, T. and Doerner, P. (1999) Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin–GUS fusion protein. *Plant J.* 20: 503–508.
- Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C. and López-Bucio, J. (2009) *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 149: 1579–1592.
- Delbarre, A., Muller, P., Imhoff, V. and Guerm, J. (1996) Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid, naphthalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta* 198: 532–541.
- del Pozo, J.C., Dharmasiri, S., Hellman, H., Walker, L., Gray, W. and Estelle, M. (2002) AXR1-ECR1-dependent conjugation of RUB1 to the Arabidopsis cullin AtCUL1 is required for auxin response. *Plant Cell* 14: 421–433.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S. and Estelle, M. (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 441–445.
- Dharmasiri, S., Swarup, R., Mockaitis, K., Dharmasiri, N., Singh, S.K., Kowalchyk, M. et al. (2006) AXR4 is required for localization of the auxin influx facilitator AUX1. *Science* 312: 1218–1220.
- Engstrom, K., Lundgren, L. and Samuelsson, G. (1992) Bioassay-guided isolation of serotonin from fruits of *Solanum tuberosum* L. *Acta Pharm. Nord.* 4: 91–92.
- Frazer, A. and Hensler, J.G. (1999) Understanding the neuroanatomical organization of serotonin cells in brain provides insight into functions of this neurotransmitter. In *Basic Neurochemistry*. Edited by Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Fisher, S.K., Albers, R.W. and Uhler, M.D. pp. 264–268. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
- Fujita, H. and Syono, K. (1996) Genetic analysis of the effects of polar auxin transport inhibitors on root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 37: 1094–1101.
- Fukaki, H., Tameda, S., Masuda, H. and Tasaka, M. (2002) Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of Arabidopsis. *Plant J.* 29: 153–168.
- Geldner, N., Anders, N., Wolters, H., Keicher, J., Kornenberg, W., Muller, P. et al. (2003) The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* 112: 219–230.
- Gray, W.M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O. and Estelle, M. (2001) Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 414: 271–276.
- Grose, W. (1982) Function of serotonin of walnuts. *Phytochemistry* 21: 819–822.
- Hayashi, K., Jones, A.M., Ogino, K., Yamazoe, A., Oono, Y., Inoguchi, M. et al. (2003) Yokonolide B, a novel inhibitor of auxin action, blocks degradation of AUX/IAA factors. *J. Biol. Chem.* 278: 23797–23806.
- Hayashi, K., Tan, X., Zheng, N., Hatate, T., Kimura, Y., Kepinski, S. et al. (2008) Small-molecule agonists and antagonists of F-box protein–substrate interactions in auxin perception and signaling. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105: 5632–5637.

- Hobbie, L. and Estelle, M. (1995) The *axr4* auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene important for root gravitropism and lateral root initiation. *Plant J.* 7: 211–220.
- Ishihara, A., Hashimoto, Y., Tanaka, C., Dubouzet, J., Nakao, T., Matsuda, F. et al. (2008) The tryptophan pathway is involved in the defense responses of rice against pathogenic infection via serotonin production. *Plant J.* 54: 481–495.
- Kang, K., Kang, S., Lee, K., Park, M. and Back, K. (2008) Enzymatic features of serotonin biosynthetic enzymes and serotonin biosynthesis in plants. *Plant Signal Behav.* 3: 389–390.
- Kang, K., Kim, Y.S., Park, S. and Back, K. (2009a) Senescence-induced serotonin biosynthesis and its role in delaying senescence in rice leaves. *Plant Physiol.* 150: 1380–1393.
- Kang, K., Park, S., Kim, Y.S., Lee, S. and Back, K. (2009b) Biosynthesis and biotechnological production of serotonin derivatives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83: 27–34.
- Kang, S., Kang, K., Lee, K. and Back, K. (2007a) Characterization of tryptamine 5-hydroxylase and serotonin synthesis in rice plants. *Plant Cell Rep.* 26: 2009–2015.
- Kang, S., Kang, K., Lee, K. and Back, K. (2007b) Characterization of rice tryptophan decarboxylases and their direct involvement in serotonin biosynthesis in transgenic rice. *Planta* 227: 263–272.
- Kepinski, S. and Leyser, O. (2005) The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 446–451.
- Kieffer, M., Neve, J. and Kepinski, S. (2010) Defining auxin response contexts in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 12–20.
- Lau, S., Jürgens, G. and De Smet, I. (2008) The evolving complexity of the auxin pathway. *Plant Cell* 20: 1738–1746.
- Leyser, O. (2006) Dynamic integration of auxin transport and signaling. *Curr. Biol.* 16: R424–R433.
- Lincoln, C., Britton, J.H. and Estelle, M. (1990) Growth and development of the *axr1* mutant of Arabidopsis. *Plant Cell* 2: 1071–1080.
- Ljung, K., Hull, A.K., Kowalczyk, M., Marchant, A., Celenza, J., Cohen, J.D. et al. (2002) Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 50: 309–332.
- López-Bucio, J., Acevedo-Hernández, G., Ramírez-Chávez, E., Molina-Torres, E. and Herrera-Estrella, L. (2006) Novel signals for plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 280–287.
- López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A. and Herrera-Estrella, L. (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 280–287.
- López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., Pérez-Torres, A., Ramírez-Pimentel, J.G., Sánchez-Calderón, L. and Herrera-Estrella, L. (2005) Root architecture. In *Plant Architecture and its Manipulation* (Annual Review Series). Edited by Turnbull, C. pp. 182–208. Blackwell, Oxford.
- Malamy, J.E. and Benfey, P.N. (1997a) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124: 33–44.
- Malamy, J. and Benfey, P. (1997b) Down and out in *Arabidopsis*: the formation of lateral roots. *Trends Plant Sci.* 2: 390–401.
- Marchant, A., Kargul, J., May, S.T., Muller, P., Delbarre, A., Perrot-Rechenmann, C. et al. (1999) AUX1 regulates root gravitropism in Arabidopsis by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO J.* 18: 2066–2073.
- Mockaitis, K. and Estelle, M. (2008) Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24: 55–80.
- Mravec, J., Kubes, M., Bielach, A., Gaykova, V., Petrášek, J., Skůpa, P. et al. (2008) Interaction of PIN and PGP transport mechanisms in auxin distribution-dependent development. *Development* 135: 3345–3354.
- Murch, S.J., Campbell, S.S.B. and Saxena, P. (2001) The role of serotonin and melatonin in plant morphogenesis: regulation of auxin-induced root organogenesis in in vitro-cultured explants of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 37: 786–793.
- Nagpal, P., Walker, L., Young, J.C., Sonawala, A., Timpote, C., Estelle, M. et al. (2000) AXR2 encodes a member of the Aux/IAA protein family. *Plant Physiol.* 123: 563–573.
- Odjakova, M. and Hadjiivanova, C. (1997) Animal neurotransmitter substances in plants. *Bulg. J. Plant Physiol.* 23: 94–102.
- Oono, Y., Chen, Q.G., Overvoorde, P.J., Kohler, C. and Theologis, A. (1998) *age* mutants of Arabidopsis exhibit altered auxin-regulated gene expression. *Plant Cell* 10: 1649–1662.
- Oono, Y., Ooura, C., Rahman, A., Aspuria, E., Hayashi, K., Tanaka, A. et al. (2003) *p*-Chlorophenoxyisobutyric acid impairs auxin response in Arabidopsis root. *Plant Physiol.* 133: 1135–1147.
- Parker, J.S., Cavell, A., Dolan, L., Roberts, K. and Grierson, C.S. (2000) Genetic interactions during root hair morphogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell* 12: 1961–1974.
- Pickett, F.B., Wilson, A.K. and Estelle, M. (1990) The *aux1* mutation of Arabidopsis confers both auxin and ethylene resistance. *Plant Physiol.* 94: 1462–1466.
- Péret, B., de Rybel, B., Casimiro, I., Benková, E., Swarup, R., Laplace, L. et al. (2009) Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci.* 14: 399–408.
- Rogg, L.E., Lasswell, J. and Bartel, B. (2001) A gain-of-function mutation in *IAA28* suppresses lateral root development. *Plant Cell* 13: 465–480.
- Roshchina, V.V. (2001) *In Neurotransmitters in Plant Life*. pp. 4–81. Science Publishers, Enfield, NH.
- Schlicht, M., Strnad, M., Scanlon, M., Mancuso, S., Hochholdinger, F., Palme, K. et al. (2006) Auxin immunolocalization implicates vesicular neurotransmitter-like mode of polar auxin transport in root apices. *Plant Signal. Behav.* 1: 122–133.
- Sieberer, T., Hauser, M.T., Seifert, G.J. and Lusching, C. (2003) *PROPORZ1*, a putative Arabidopsis transcriptional adaptor protein, mediates auxin and cytokinin signals in the control of cell proliferation. *Curr. Biol.* 13: 837–842.
- Staswick, P.E. (2009) The tryptophan conjugates of jasmonic acid and indole-3-acetic acids are endogenous auxin inhibitors. *Plant Physiol.* 150: 1310–1321.
- Swarup, R., Kargul, J., Marchant, A., Zadik, D.P., Rahman, A., Mills, R. et al. (2004) Structure–function analysis of the presumptive Arabidopsis auxin permease AUX1. *Plant Cell* 16: 3069–3083.
- Tatematsu, K., Kumagai, S., Muto, H., Sato, A., Watahiki, M.K., Harper, R.M. et al. (2004) *MASSUGU2* encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 16: 379–393.

- Tian, Q. and Reed, J.W. (1999) Control of auxin-regulated root development by the *Arabidopsis thaliana* *SHY2/IAA3* gene. *Development* 126: 711–721.
- 5 Timppte, C., Wilson, A.K. and Estelle, M. (1994) The *axr2-1* mutation of *Arabidopsis thaliana* is a gain-of-function mutation that disrupts an early step in auxin response. *Genetics* 138: 1239–1249.
- Uehara, T., Okushima, Y., Mimura, T., Tasaka, M. and Fukaki, H. (2008) Domain II mutations in *CRANE/IAA18* suppress lateral root formation and affect shoot development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 49: 1025–1038.
- 10 Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G. and Guilfoyle, T. (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9: 1963–1971.
- Walch-Liu, P., Lai-Hua, L., Remans, T., Tester, M. and Forde, B.G. (2006) Evidence that L-glutamate can act as an exogenous signal to modulate root growth and branching in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 47: 1045–1057.
- Woodward, A.W. and Bartel, B. (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann. Bot.* 95: 707–735.
- 20 Yamazoe, A., Hayashi, K., Kepinski, S., Leyser, O. and Nozaki, H. (2005) Characterization of Terfestatin A, a new specific inhibitor for auxin signaling. *Plant Physiol.* 139: 79–789.

Characterization of *drr1*, an Alkamide-Resistant Mutant of *Arabidopsis*, Reveals an Important Role for Small Lipid Amides in Lateral Root Development and Plant Senescence^{1[C][W][OA]}

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.109.149989

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

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

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

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

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

RESULTS

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

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

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

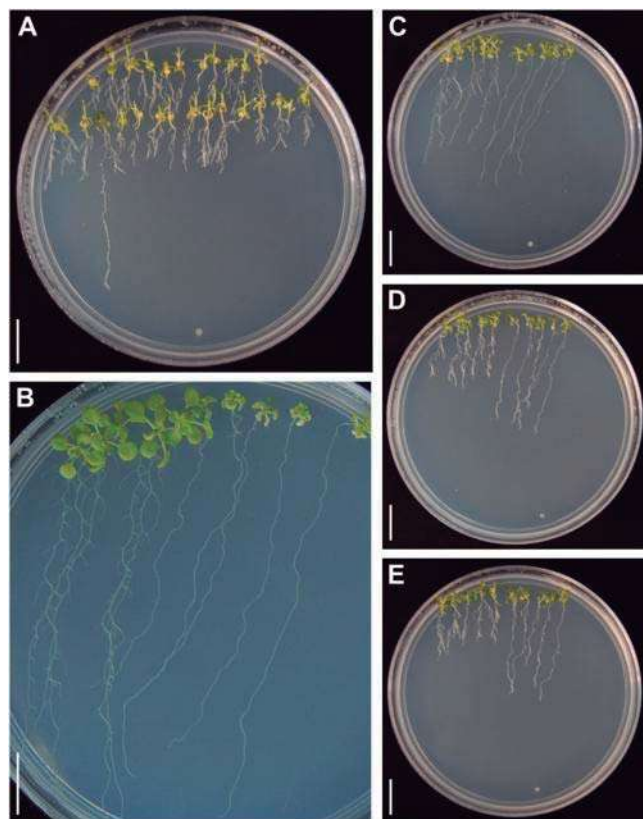


Figure 1. Genetic screen and phenotypic characterization of *drr1* mutants. A, Photograph of an agar plate supplied with 30 μM *N*-isobutyl decanamide showing a putative *drr1* mutant with long primary root. B, Five 14-d-old wild-type (Ws) and *drr1* seedlings grown side by side on the surface of agar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

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

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

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

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

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

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

^aWith one degree of freedom and a critical value of 5%, the hypothesis is accepted if the χ^2 is smaller than 3.841.

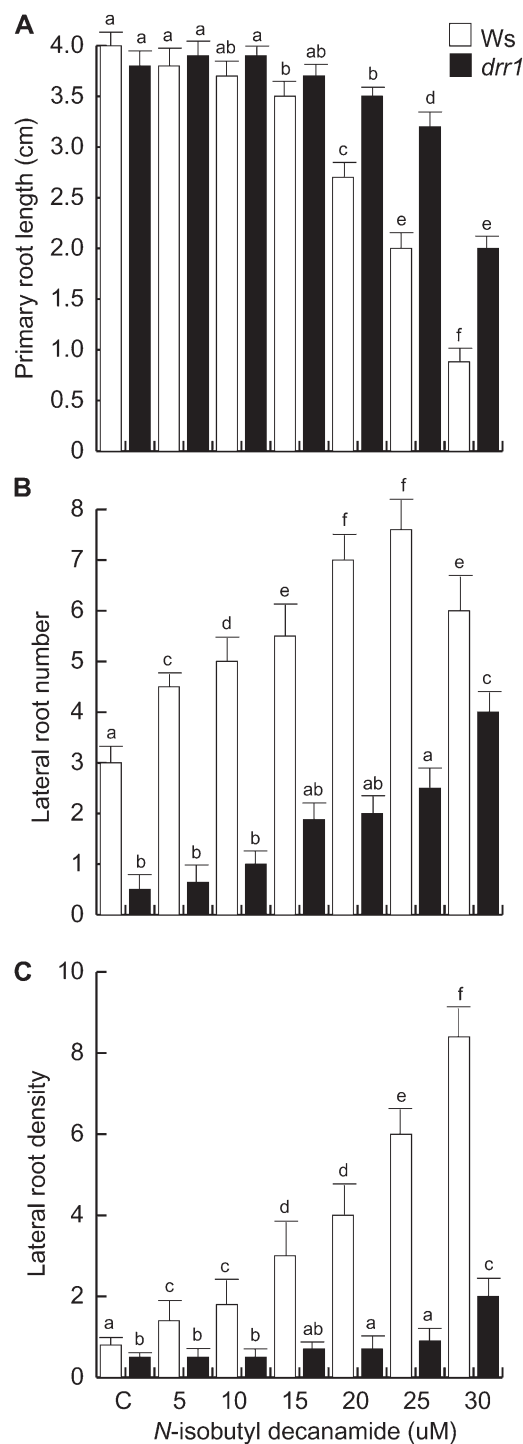


Figure 2. Effects of *N*-isobutyl decanamide on the root system architecture of wild-type (Ws) and *drr1* plants. A, Primary root length. B, Number of emerged LRs per plant. C, LR density expressed as the number of LRs per centimeter. Data were recorded at 12 d after germination. Values shown are means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

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

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

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

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

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

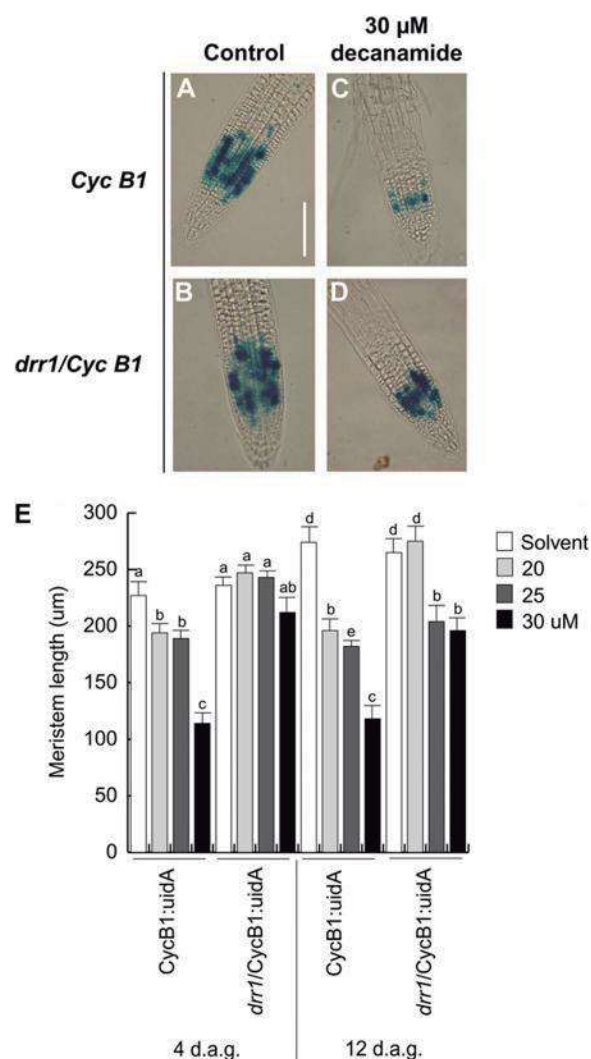


Figure 3. *CycB1:uidA* expression in transgenic wild-type and *drr1* seedlings. Twelve-hour GUS staining is shown for *CycB1:uidA* primary roots in wild-type and *drr1* Arabidopsis seedlings grown on agar-solidified 0.2 $\times$ MS medium with or without *N*-isobutyl decanamide. A and B, Solvent-treated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

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

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

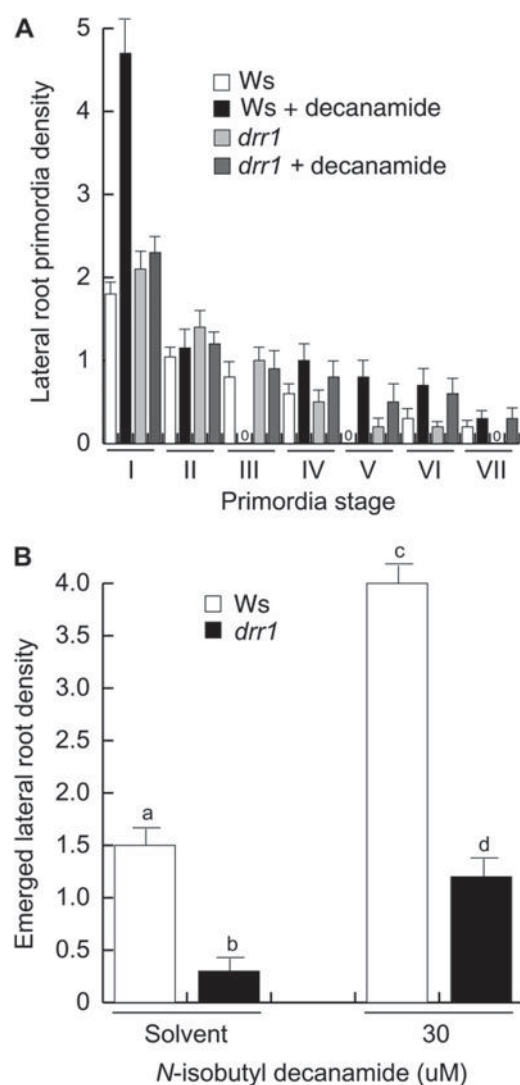


Figure 4. Effects of *N*-isobutyl decanamide on wild-type (Ws) and *drr1* LR development. A, LRP stage distribution in 6-d-old primary roots grown on medium supplied with the solvent only or with 30 μ M *N*-isobutyl decanamide (indicated as decanamide). B, Emerged LR density in the same experiment. Wild-type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

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

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

drr1 Shows Normal Auxin Responses

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

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

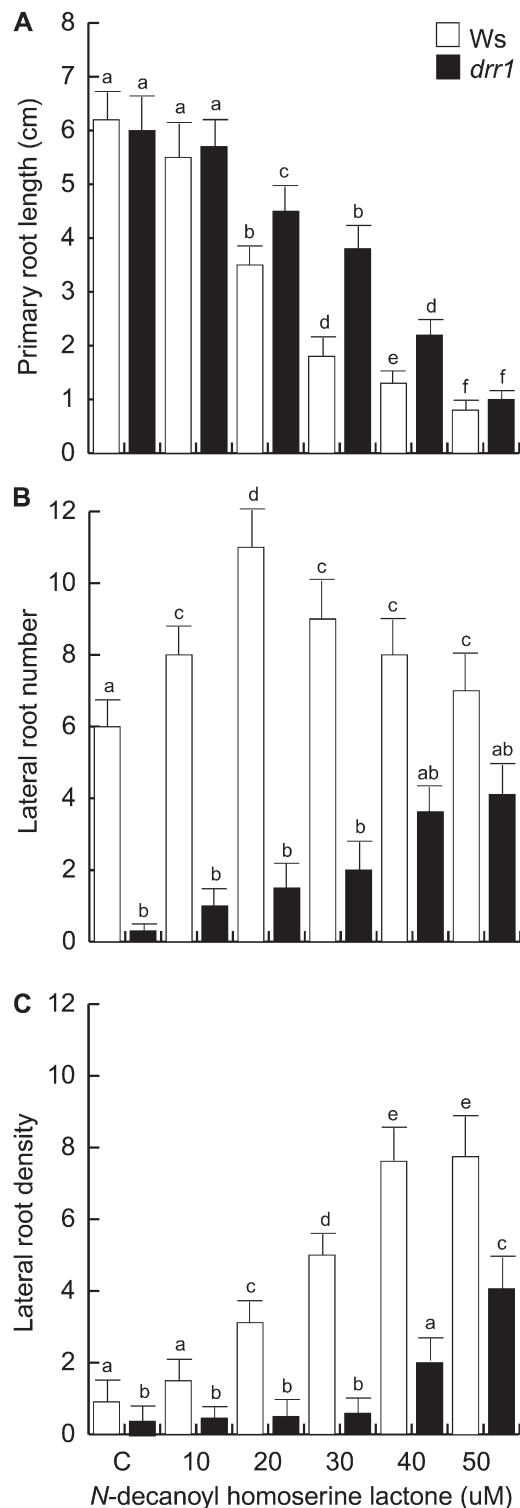


Figure 5. Effects of C10-AHL on the root system architecture of wild-type (Ws) and *drr1* plants. A, Primary root length. B, Number of emerged LRs per plant. C, LR density expressed as the number of LRs per centimeter. Data were recorded at 14 d after germination. Values shown are means $\pm$ SD ($n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

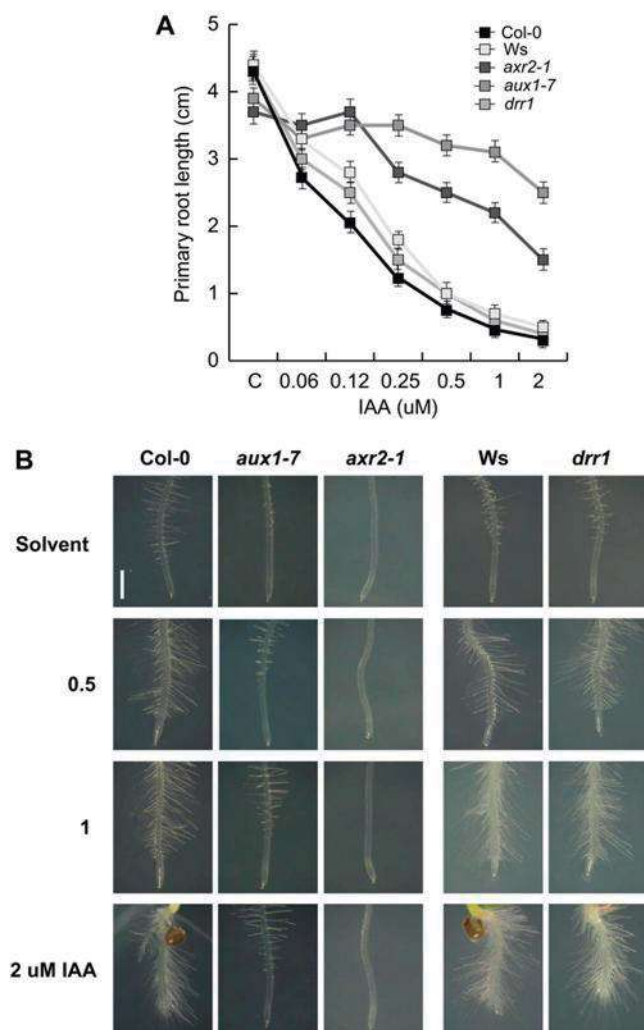


Figure 6. Auxin responses in wild-type and *drr1* seedling roots. A, Primary root growth in 12-d-old primary roots of wild-type (Col-0 and Ws), *auxr2-1* and *aux1-7* auxin-resistant mutants, and *drr1* Arabidopsis mutants grown on medium supplied with the solvent only or with varied IAA concentrations.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

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

drr1 Mutants Show Extended Longevity

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

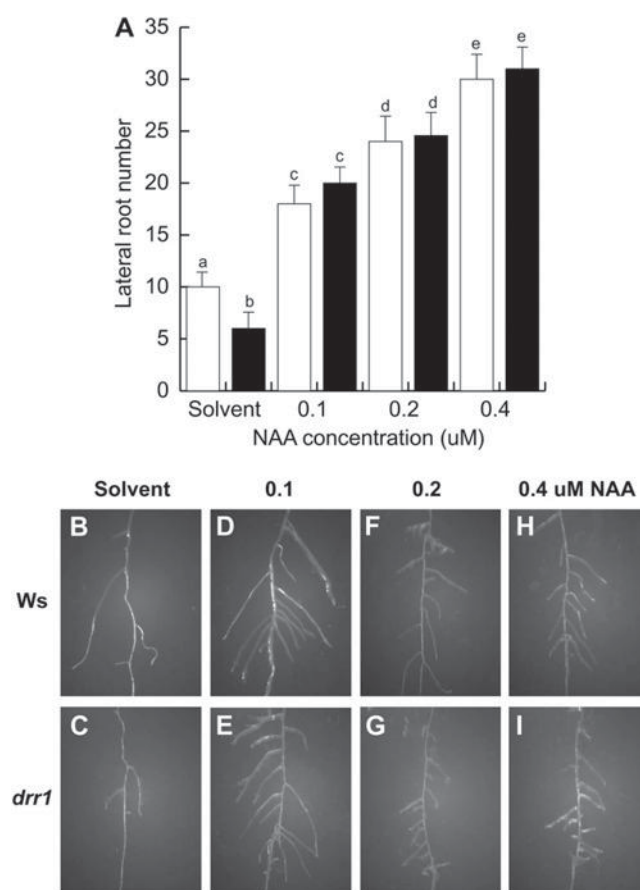
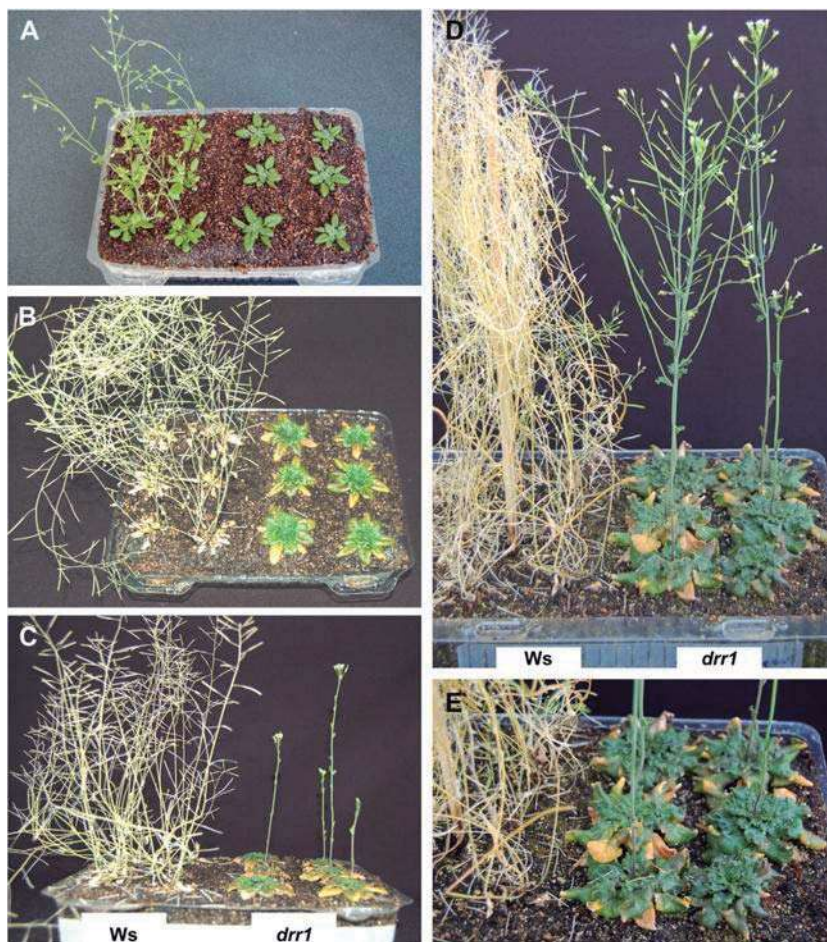


Figure 7. Auxin restoration of LR development in *drr1* plants. A, Total LR number per plant in 11-d-old wild-type (Ws) and *drr1* plants that were first grown for 7 d in 0.2 $\times$ MS agar medium and then transferred to 0.2 $\times$ MS liquid medium supplied with the solvent or with varied concentrations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

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



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

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

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

drr1 Is Altered in Jasmonate-Mediated LR Induction

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

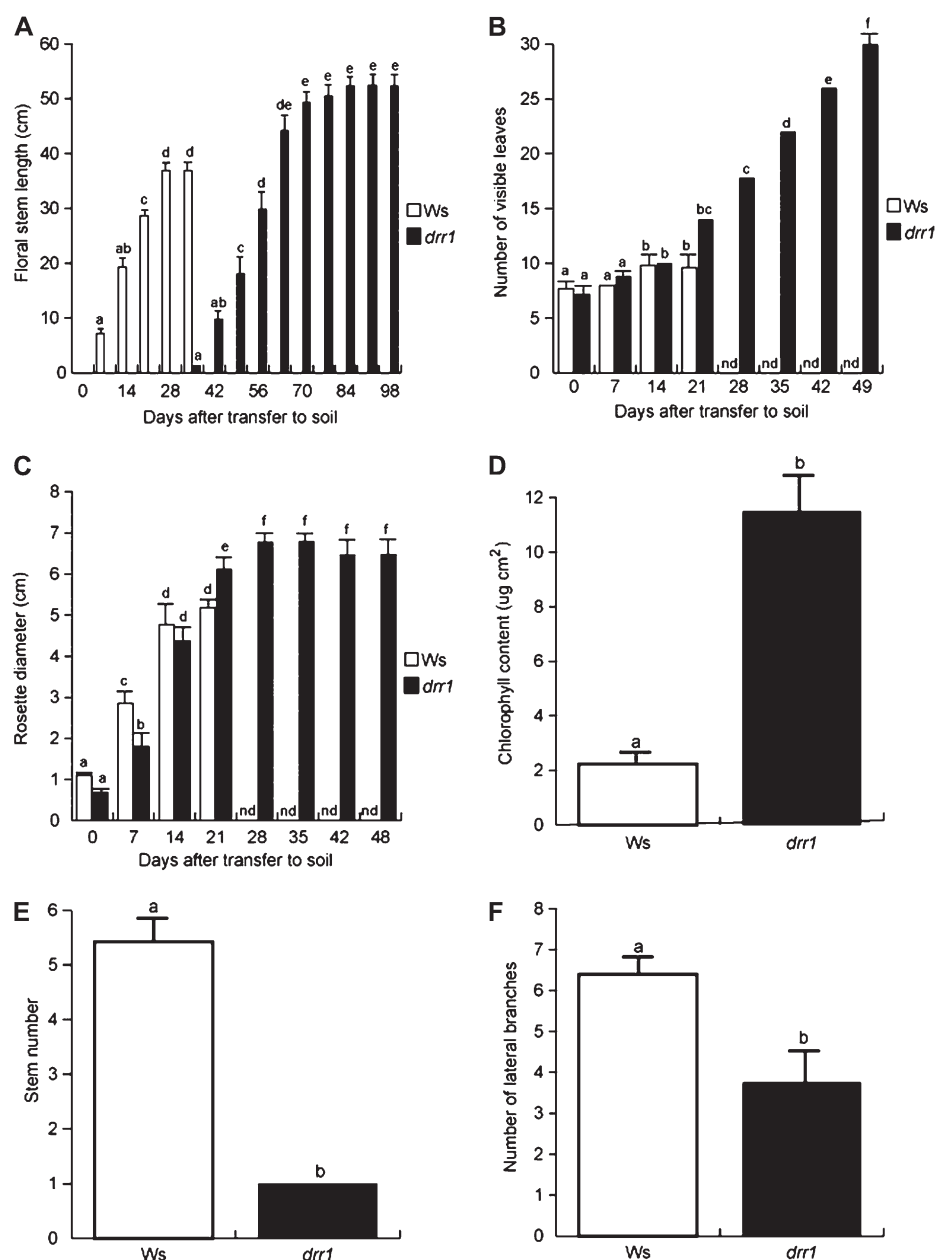


Figure 9. Age-dependent senescence symptoms and other developmental traits of wild-type (Ws) and *drr1* plants grown in soil. A, Age-dependent stem size. B, Rosette diameter. C, Number of visible rosette leaves. D, Chlorophyll content in rosette leaves at 28 d after transfer to soil. E, Stem number.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

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

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

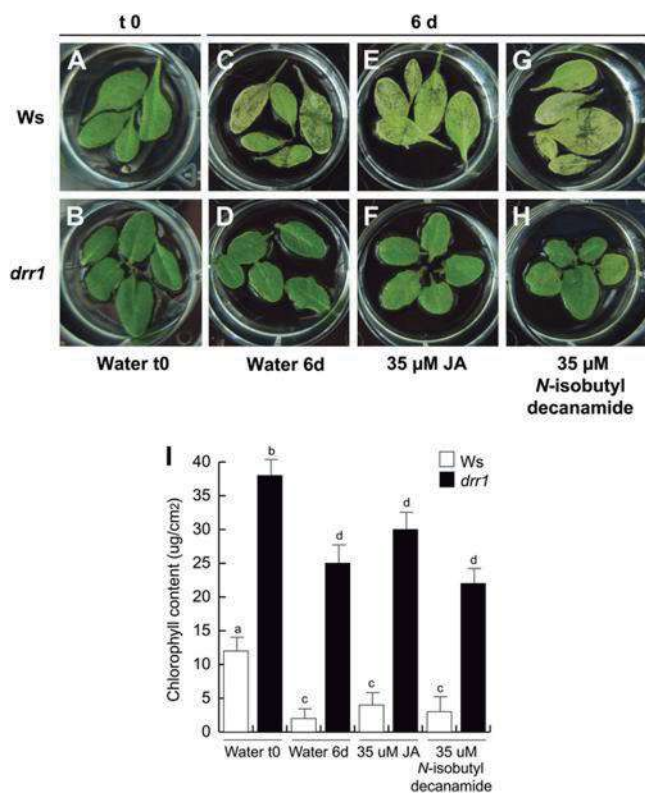


Figure 10. Hormone-dependent senescence symptoms in the *drr1* mutant. Detached leaves of wild-type (Ws) and *drr1* plants were incubated in 2-mL water solutions supplied with the indicated concentrations of compounds. The plates were included in a growth chamber (Percival ARR95L) under dark conditions,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

DISCUSSION

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

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

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

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

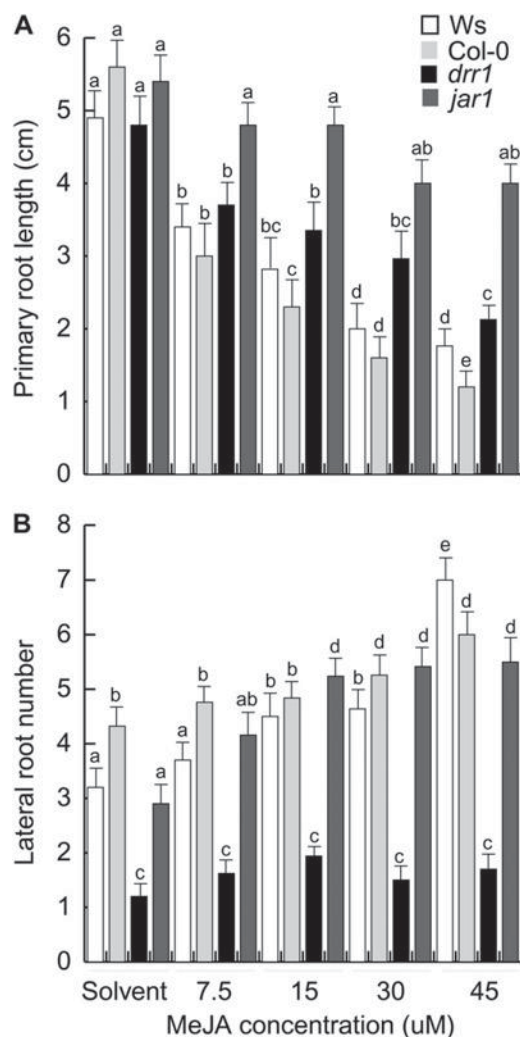


Figure 11. Effects of JA on primary root growth and LR development in wild-type (Ws and Col-0) and mutant (*drr1* and *jar1*) lines. A, Primary root length. B, Number of emerged LRs per plant. Data were recorded at 12 d after germination. Values shown are means $\pm$ SD ($n = 20$). Different letters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

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

Many bacterial species use small molecule signaling to communicate with each other and to coordinate their growth activities, a process commonly referred to as quorum sensing (Taga and Bassler, 2003; Reading and Sperandio, 2006). Diverse gram-negative bacteria produce AHLs, and these compounds contain a conserved HL ring and an *N*-linked acyl side chain. Our previous work indicated that saturated medium (C8–C14)-chained AHL compounds showed a dose-dependent effect on root architecture, inhibiting primary root growth and promoting LR formation (Ortíz-Castro et al., 2008). In this work, we used the *dr1* mutant to determine whether alkarnides and AHLs could be perceived by similar genetic mechanisms. We show that C10-AHL inhibited primary root growth and promoted LR formation in *Arabidopsis* wild-type seedlings (Fig. 5). *dr1* mutants showed reduced sensitivity to both *N*-isobutyl decanamide and C10-AHL, indicating a potential genetic interaction in plant responses to alkarnides and AHLs in roots. These results also suggest that plants have evolved the capacity to sense AHLs in order to activate developmental responses.

Several reports indicate that bacteria commonly associated with plants are capable to produce a variety of AHLs (Cha et al., 1998; Elasm et al., 2001; Khmel et al., 2002; D'Angelo-Picard et al., 2005). Several strains of *Pseudomonas* have been studied for their ability to colonize plant-related niches, such as the rhizosphere (i.e. *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, and *P. putida*), where they can act as plant growth-promoting rhizobacteria by antagonizing plant-deleterious microorganisms and through the production of traits that directly influence plant disease resistance and growth (Venturi, 2006). The rhizospheric *P. putida* plant beneficial strains WCS358 and IsoF produce 3-oxo-C₁₂-AHL, whereas in the rhizosphere-colonizing biocontrol *P. fluorescens* strain F₁₃, the production of three AHL molecules, including C10-AHL, has been reported (Laue et al., 2000; Venturi, 2006). Interestingly, C10-AHL and C12-AHL seem to be also produced in the nitrogen-fixing bacterial symbiont *Sinorhizobium meliloti* (Marketon et al., 2002; Teplitski et al., 2003). The marked resistance of *dr1* to C10-AHL on root development opens new possibilities to identify novel genetic determinants involved in plant-bacteria interactions. Furthermore, the *dr1* mutant can be used as a tool to identify novel plant growth-promoting bacterial strains, which could modulate root system architecture through AHL production.

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

sponsible for reduced LR formation in *dr1* mutants. Our results, however, showed that *dr1* mutants are not resistant to IAA or NAA treatments in terms of primary root growth inhibition or LR formation (Figs. 6 and 7), indicating that *DRR1* might not be directly connected to the auxin response pathway to modulate plant growth and development. These results are in agreement with our previous research showing that both alkarnides and AHLs modulate root system architecture, likely through auxin-independent signaling mechanisms (Ramírez-Chávez et al., 2004; Campos-Cuevas et al., 2008; Ortíz-Castro et al., 2008).

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

Senescence is a developmental process that limits the longevity of an organism. Genetic studies of longevity mutants have also suggested that some common mechanisms, such as alterations in energy metabolism and oxidative damage, might play a role in determining life span in animals as divergent as nematodes, *Drosophila*, and mammals (Lin et al., 1998; Parkes et al., 1998). Plants also undergo a distinctive senescence process at the organ and/or organism level. A number of studies have provided evidence suggesting that leaf senescence is an active process controlled by a genetic program (Woo et al., 2001, 2002; Schommer et al., 2008). However, our understanding of how senescence and longevity are controlled at the whole plant level remains quite limited. Our results suggest that LR development and age-dependent plant senescence are directly connected through *DRR1*. Obvious alterations were seen in *dr1* plants grown in soil under long days (16-h-light/8-h-dark conditions). In *dr1* plants, leaf senescence was delayed by about 4 to 5 weeks when compared with wild-type plants (Figs. 8 and 9). The extended longevity of leaves was related to an extended growth period as well as to slower onset and/or progression of senescence after the maturation stage. The reduced growth observed at early stages of development in *dr1* mutants opens the possibility that it may contribute to extended longevity. Consistent with this hypothesis, we observed that reduced LR formation was not caused by the failure of the pericycle to produce these structures but by the retarded development of LRP to emerge from the primary root (Fig. 4). In this way, the *dr1* mutation shows a senescence character that differs from the delayed leaf senescence phenotype observed in the *oresara* (*ore*) and *teosinte branched/cycloidea*/PCF (*tcp*) mutants described previously (Woo et al., 2001, 2002; Schommer et al., 2008). In *ore* mutants, the retarded senescence phenotype seems to be specifically observed in leaves. For instance, the leaf longevity in *ore9-1* was extended only by about 27%, without affecting other developmental traits such as flowering time and/or plant size (Woo et al., 2001). To our knowledge, no LR phenotypes have been reported for leaf senescence mutants such as the *ore* and *tcp* lines. Interestingly, the *dr1* mutants also show that

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

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

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

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

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

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

MATERIALS AND METHODS

Plant Material and Growth Conditions

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

Mutant Isolation Procedure

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

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

Genetic Analysis of *drr1* Mutants

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

Hormone Treatments

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

Analysis of Growth and Statistical Analysis

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

Determination of Developmental Stages of LRP

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

Chlorophyll Determination

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

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

Histochemical Analysis of GUS Activity

Transgenic plants that express the *uidA* reporter gene (Jefferson et al., 1987) were stained in 0.1% 5-bromo-4-chlorium-3-indolyl- β -D-glucuronide in phosphate buffer (NaH₂PO₄ and Na₂HPO₄, 0.1 M, pH 7) with 2 mM potassium ferrocyanide and 2 mM potassium ferricyanide for 12 h at 37 °C. Plants were cleared and fixed as described previously by Malamy and Benfey (1997). The processed roots were included in glass slips and sealed with commercial nail varnish. For each marker line and for each treatment, at least 10 transgenic plants were analyzed.

Microscopy

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

Supplemental Data

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

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

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

ACKNOWLEDGMENTS

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

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

LITERATURE CITED

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

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

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



Tissue culture of *Arabidopsis thaliana* explants reveals a stimulatory effect of alkamides on adventitious root formation and nitric oxide accumulation

Juan Carlos Campos-Cuevas, Ramón Pelagio-Flores, Javier Raya-González, Alfonso Méndez-Bravo, Randy Ortiz-Castro, José López-Bucio *

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

Received 14 September 2007; received in revised form 30 October 2007; accepted 5 November 2007

Available online 17 November 2007

Abstract

Alkamides and *N*-acylethanolamines represent a new class of lipid compounds related to animal endocannabinoids, which regulate different aspects of plant morphogenesis. To elucidate further the plant regenerative properties of alkamides and their role on plant development, we used an *in vitro* system to cultivate *Arabidopsis thaliana* explants under varied concentrations of *N*-isobutyl decanamide and *N*-isobutyl-2*E*,6*Z*,8*E*-decatrienamide (affinin). Cultivation of explants that harbor the shoot apical meristem on MS 0.2× medium lacking alkamides resulted in formation of mature plants with fully developed shoot and root systems. On the contrary, explants obtained from stems or primary roots resulted in development of two main classes of regenerative structures: adventitious roots and lateral roots, depending on the source of explants. *N*-Isobutyl decanamide treatments showed a dose-dependent effect on adventitious and lateral root formation from stem and primary root explants, respectively, and in growth of regenerated plants. The stimulatory effect of *N*-isobutyl decanamide and affinin on adventitious root formation was further confirmed in *A. thaliana* seedlings. Although the effects of alkamides were similar to those produced by auxins on adventitious root development, the ability of shoot explants to respond to alkamides was found to be independent of auxin signaling. Furthermore, we show that *N*-isobutyl decanamide is able to induce nitric oxide accumulation in sites of adventitious root proliferation. Our results suggest a role for alkamides in regulating adventitious root development, probably operating through the NO signal transduction pathway.

© 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*; Alkamides; Root architecture; Adventitious roots; Nitric oxide

1. Introduction

Plants produce compounds of different chemical identity that mediate a range of cellular functions including auxins, cytokinins, gibberellins, abscisic acid, brassinosteroids and ethylene. These compounds are considered as plant hormones because of their widespread occurrence in plants and their diverse physiological roles [1].

In the past 5 years, it has become evident that plants use – along with the above mentioned classical hormones – a diverse

array of small molecules for extra- and intracellular signaling. Of particular interest are the plant lipids because, like their mammalian counterparts, they act not only as structural components of membranes but also as signaling molecules that regulate developmental and adaptive responses to environmental stimuli [2,3]. *N*-Acylethanolamides (NAEs) comprise a group of lipids, which are produced from the hydrolysis of *N*-acylphosphatidylethanolamide (NAPE), a minor lipid constituent of cell membranes, by phospholipase D (PLD) [4]. There is information indicating that NAEs might be involved in diverse physiological processes, including seed germination, pathogenesis, regulation of root architecture and response to herbivory [5–7]. NAE related compounds include alkamides (*N*-alkyl amides), which have been found to alter root development and to regulate cell division and differentiation processes in *Arabidopsis thaliana* [8,9].

* Corresponding author at: Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Av. Francisco J. Múgica S/N, Edificio B3, Ciudad Universitaria, CP 58030 Morelia, Michoacán, Mexico. Tel.: +52 443 3265788x122; fax: +52 443 3265788x103.

E-mail address: jbucio@zeus.umich.mx (J. López-Bucio).

Two reports indicate that alkamides may act as plant growth regulating substances. Kanbe et al. showed that amidinin, a non-substituted alkamide isolated from the actinomycete *Amycolatopsis* sp., promoted the growth of rice (*Oryza sativa*) plants at concentrations of 0.6 and 1.8×10^{-5} M and inhibited growth at concentration of 6×10^{-5} M [10]. More recently, our group evaluated the effects of affinin, an alkamide produced in *Heliopsis longipes* roots, and its reduced amides in the growth and development of *A. thaliana* seedlings [8]. Together with a general plant growth promoting effect, affinin showed a dose-dependent effect in primary root growth, increased growth of root hairs and lateral roots at concentration of 2.8×10^{-5} M, and decreased lateral root growth at higher concentrations. The repressing effect of affinin on primary root growth correlated with an inhibition in proliferative activity in the primary root meristem and reduced cell elongation [8]. These observations, and the known regulatory functions of NAEs and alkamides in animal systems, indicate that the participation of alkamides is likely to be demonstrated for many cellular and morphogenetic processes in plants [9].

In this study, we report a further characterization of the plant regenerative properties of two alkamides, namely *N*-isobutyl decanamide, and *N*-isobutyl-2*E*,6*Z*,8*E*-decatrienamide. The role of these compounds in plant development was investigated by cultivating explants from *A. thaliana* etiolated plants under varied concentrations of exogenously applied alkamides. We observed differential effects of alkamide treatment depending on the source of the explants that included increased growth of regenerated plants and a stimulation of adventitious root formation, a process not previously reported to be regulated for this class of signaling molecules. The role of auxin in mediating the adventitious root proliferating activity of alkamides was tested using the auxin responsive marker gene *DR5:uidA* and *axr2-1*, *eir1-1*, *aux1-7*, and *axr4-1* auxin-resistant *A. thaliana* mutants. In addition, nitric oxide (NO) accumulation was detected by confocal microscopic analysis in cultured shoot explants. All together, our results suggest a novel role for alkamides in the regulation of adventitious root development, acting independently of auxin, and probably operating in the NO signal transduction pathway.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and growth conditions

Arabidopsis (Col-0 ecotype) WT and *DR5:uidA* [11] transgenic plants were used for the different experiments and as the source of explants. *Arabidopsis* mutant *eir1* [12] was kindly provided by Dr. Plinio Guzmán (Departamento de Ingeniería Genética, Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Irapuato, Gto. México). *aux1-7* [13], *axr4-1* [14], and *axr2* [15] were kindly provided by Dr. Claire Grierson (School of Biological Sciences, University of Bristol, Bristol, UK). Seeds were surface sterilized with 95% (v/v) ethanol for 5 min and 20% (v/v) bleach for 7 min. After five washes with sterile distilled water, seeds were germinated and grown on agar plates containing 0.2× MS medium. MS

medium (Murashige and Skoog basal salts mixture, Cat. M5524) was purchased from Sigma. The suggested formulation is 4.3 g/l of salts for a 1× concentration of medium, we used 0.9 g/l, which we consider and refer as MS 0.2×. This medium lacks aminoacids and vitamins. *N*-Isobutyl decanamide and affinin were added to cooled (50 °C) molten medium and poured into plates. Phytagar (micropropagation grade) was purchased from Phytotechnology (Shawnee Mission, KS, USA). Plates were placed vertically at an angle of 65° to allow root growth along the agar surface and to allow unimpeded aerial growth of the hypocotyls. Plants were placed in a plant growth chamber (Percival Scientific AR95L) with a photoperiod of 16 h of light, 8 h darkness, light intensity of $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and temperature of 22 °C. For dark grown plants, seeds were sown on the surface of agar plates and the plates covered by four layers of aluminum foil. Plants were included in the growth chamber for 7 d until development of long hypocotyls. Etiolated seedlings were selected on the basis of the continuous growth of the stem that ensures a suitable source of plant tissue, and the developmentally inhibited growth mode of the root and shoot systems. These combined properties represent a good experimental system to evaluate the growth promoting and regenerating properties of alkamides.

2.2. Synthesis of alkamides

Affinin was purified from *H. longipes* (Gray) Blake (Asteraceae) plants collected at Xichú, Sierra Gorda of Guanajuato State, central México, and *N*-isobutyl-decanamide was obtained from affinin by catalytic reduction as described before [8].

2.3. Analysis of growth

Lateral root number was determined by counting the lateral roots present in explants, since these explants were obtained from primary roots, the lateral roots were counted from the tip to the cutting end. Fresh weight of the root and the shoot was determined with an Ohaus analytical balance with a 0.0001 g precision value. For all experiments, the overall data were statistically analyzed in the SPSS 10 program (SPSS, Chicago). Univariate and multivariate analyses with a Tukey's post hoc test were used for testing differences in growth and root developmental responses in WT and mutant plants. Different letters are used to indicate means that differ significantly ($P < 0.05$).

2.4. Microscopy

The *A. thaliana* root system was analyzed with a stereoscopic microscope (Leica MZ6). Total lateral roots were counted at a 30× magnification. The primordial phases of lateral and adventitious roots were analyzed in semi-permanent preparations of cleared roots using a composed microscope (Leica CME) at 100× or 400× magnifications. Images were captured with a SAMSUNG digital color camera SCC 131-A adapted to the microscope.

2.5. Imaging of endogenous nitric oxide

NO was monitored by incubating *A. thaliana* explants with 10 μ M of the fluorescent probe 4, 5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2 DA, Sigma, USA) in 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4). The treated explants were incubated 2 h in dark, and washed three times for 20 min with fresh buffer. Fluorescence signals were detected using a confocal laser scanning microscope (model BX50; Olympus, Japan), and monitored with an argon blue laser with an excitation line from 488 to 568 nm and an emission window from 585 to 610 nm.

3. Results

3.1. *N*-Isobutyl decanamide promotes adventitious root development from hypocotyl explants

To evaluate the effects *N*-isobutyl decanamide in organ formation from plant tissues, we used dark grown *A. thaliana* seedlings as a source of root and shoot explants. Fig. 1A shows a representative *Arabidopsis* seedling grown for 7 d in dark conditions. The seedlings exhibited etiolated growth with elongated hypocotyls topped by closed, under-developed cotyledons (Fig. 1A). The primary roots sustained moderate growth, sufficient to ensure the availability of root explants. Fig. 1B illustrates the way in which the different explants were obtained. Type I explants included the shoot apical meristem and a 0.7 cm of the stem region, type II explants included the remaining 0.7–1.0 cm stem region, whereas type III explants comprised the most distal 1.0 cm region from the primary root including the root apical meristem (Fig. 1B). Samples of the three different classes of explants were cultured for 12 d in Petri plates containing agar-MS 0.2 $\times$ medium supplied with varied concentrations of *N*-isobutyl decanamide. Fig. 2 shows the effects of alkamide treatments on plant regeneration from explants. For type I explants, cutting of hypocotyls was found

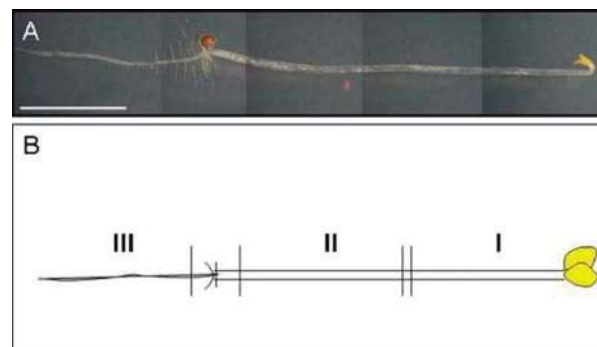


Fig. 1. Dark grown *A. thaliana* plants as a source of explants. *A. thaliana* (Col-0) seeds were sown in 0.2 $\times$ MS agar medium and grown for 7 d under dark conditions. (A) Representative 7 d seedling used as an explant source. (B) Distribution of explants from seedling regions. Scale bar = 0.5 cm.

to promote adventitious rootting. These explants developed fully expanded leaves at later times, which proceed normally in their development (Fig. 2A). Interestingly, both the length and number of adventitious roots were modified in the explants in response to *N*-isobutyl decanamide treatments (Fig. 2B–E). For type II explants, although events of adventitious root initiation proximal to the cutting ends were frequently observed, the effect of alkamide treatment was less evident and no significant differences were recorded for adventitious root formation (Fig. 2F–J). For type III explants, *N*-isobutyl decanamide increased lateral root formation and root tip swelling (Fig. 2K–O).

From 20 type I explants analyzed, concentrations of 24–48 μ M *N*-isobutyl decanamide showed a roughly twofold increase in adventitious root number ($C = 3.7 \pm 0.7$; 24 μ M = 7.2 ± 0.4 ; 36 μ M = 7.5 ± 0.3 ; 48 μ M = 6.4 ± 0.5) (Fig. 3A). On the contrary, treatments of 24–60 μ M *N*-isobutyl decanamide had an inhibitory effect on adventitious root growth (Fig. 3B).

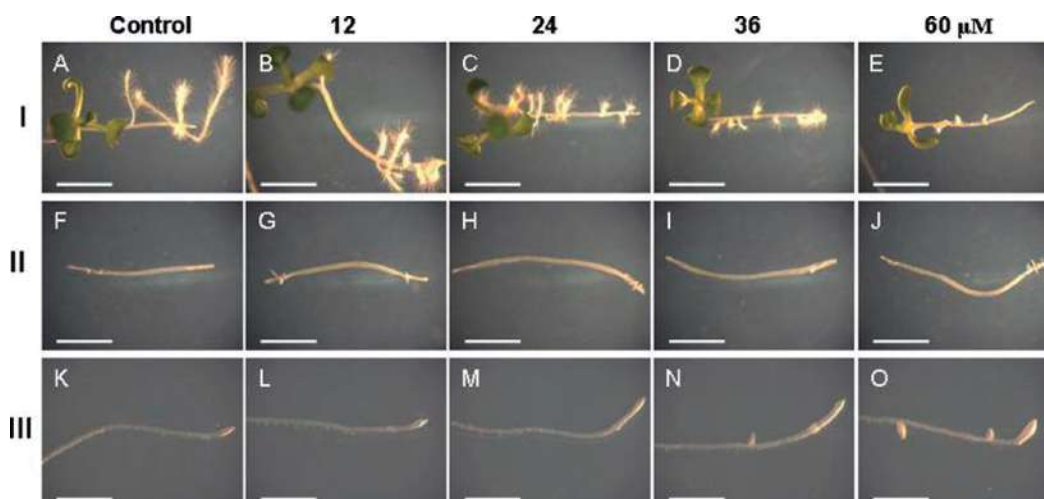


Fig. 2. Growth and developmental responses of *A. thaliana* explants to *N*-isobutyl decanamide. Representative photographs were taken from plants grown for 12 d under the indicated alkamide concentrations. Photographs were taken at 1.5 $\times$ magnification in a Leica MZ6 stereoscopic microscope. Scale bars = 0.5 cm.

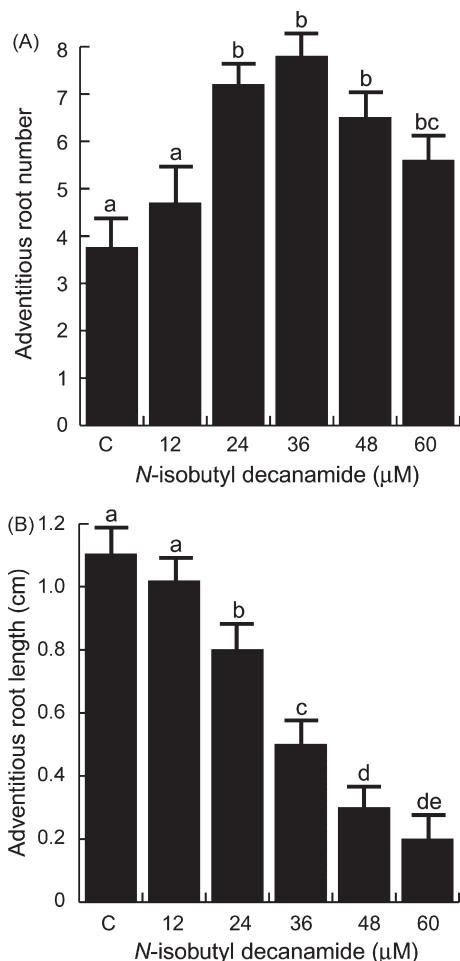


Fig. 3. Effect of *N*-isobutyl decanamide on adventitious root development from type I explants. *A. thaliana* (Col-0) hypocotyl explants were transferred to MS 0.2 $\times$ medium containing the indicated alkamide concentrations. Plants were grown for a further 14 d period and the number (A) and length (B) of adventitious root recorded. Values shown represent the mean $\pm$ S.D. ($n = 30$). The experiment was replicated two times with similar results. Different letters indicate statistical differences at $P < 0.05$.

3.2. *N*-Isobutyl decanamide promotes lateral root development in explants from primary roots

We evaluated the role on *N*-isobutyl decanamide in lateral root formation by quantifying the number of emerged lateral roots in type III explants. This compound increased significantly lateral root number at concentration of 24 μM and higher concentrations (Fig. 4A). Lateral roots were often located close to the root tip (Fig. 2K–O). To define whether this increased number of lateral roots in response to alkamide treatment could be due to a stimulation of the emergence of pre-existing lateral root primordia (LRP) or to the de novo formation of additional primordia, we counted the LRP from type III explants that were first cleared to visualize LRP. Fig. 4B shows the density of total LRP recorded at day 12 after transfer of explants to *N*-isobutyl decanamide treatments. It was found that explants treated with 36 and 48 μM *N*-isobutyl decanamide

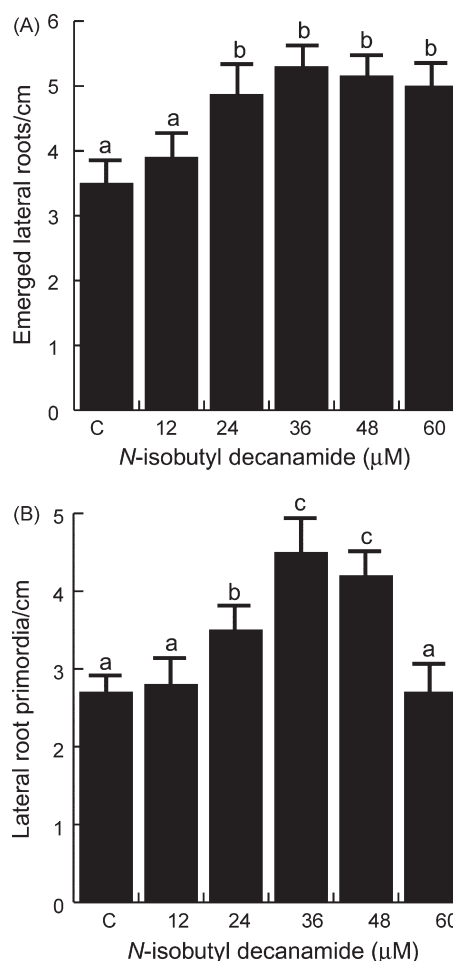


Fig. 4. Effect of *N*-isobutyl decanamide on lateral root development from type III explants. *A. thaliana* (Col-0) primary root explants were transferred to MS 0.2 $\times$ medium containing the indicated alkamide concentrations. Plants were grown for a further 14 d period and the number of emerged roots (A) and total LRP (B) recorded. Values shown represent the mean $\pm$ S.D. ($n = 30$). The experiment was replicated two times with similar results. Different letters indicate statistical differences at $P < 0.05$.

formed 67 and 56% more LRP than solvent-treated controls (Fig. 4B).

3.3. *N*-Isobutyl decanamide increases growth of regenerated *A. thaliana* plants from hypocotyl explants

As shown in Fig. 2, from the three different classes of explants used in this study, only type I explants were able to regenerate leaves and adventitious roots, which progressing in development produced fully mature shoot and root systems. Next, we monitored the growth progress of these regenerated plants at later stages of development and evaluated the effects of *N*-isobutyl decanamide treatment in this process. A dose–response growth effect was observed in plants subjected to *N*-isobutyl decanamide treatment with promoting or repressing effects depending on alkamide concentration (Fig. 5A–E). At 27 d of growth, plants were harvested and excised at the root/

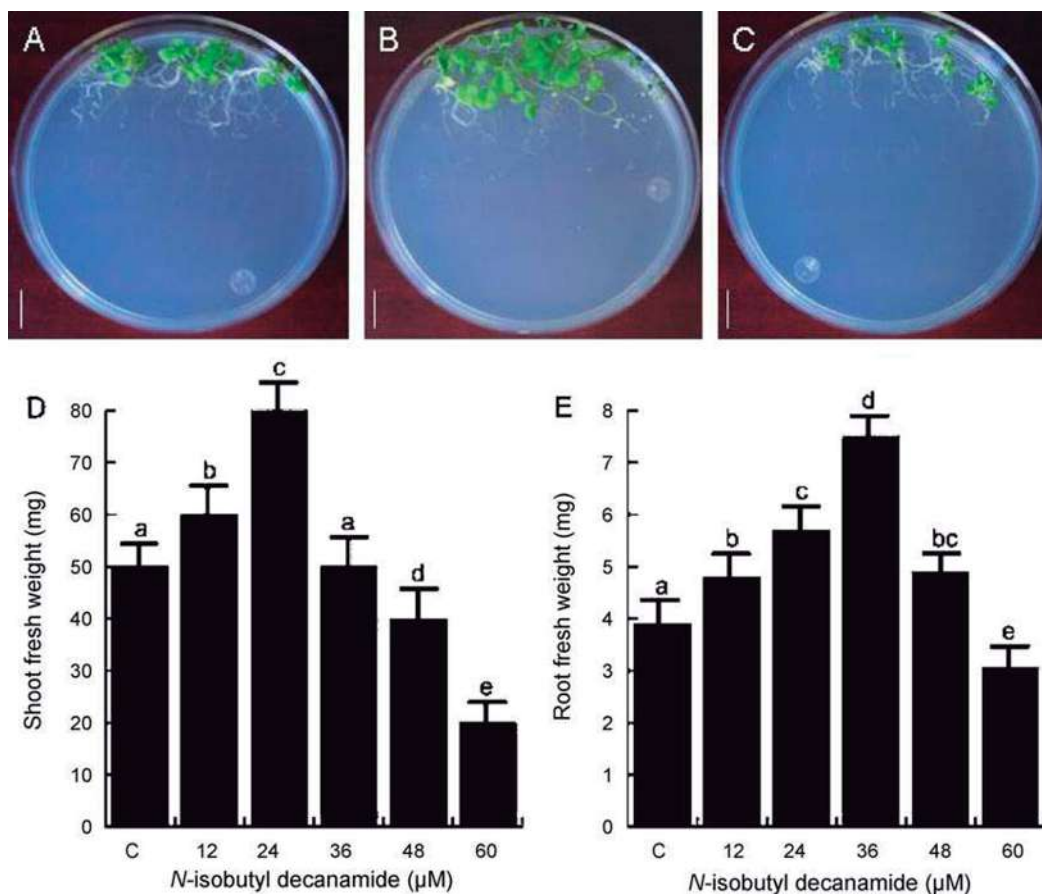


Fig. 5. Effect of *N*-isobutyl decanamide on growth of regenerated *A. thaliana* plants. Type I *A. thaliana* explants were obtained from 7 d dark-grown plants, transferred to MS 0.2× media containing the indicated *N*-isobutyl decanamide concentrations and grown for a further 27 d period. Representative pictures were taken at the end of this period. (A) Control, (B) 24, (C) 60 μM *N*-isobutyl decanamide. Plants were excised at the root/shoot junction and the shoot (D) and root fresh weight (E) determined on an analytical scale for groups of 10 plants. Values shown represent the mean ± SD ($n = 30$). Each experiment consisted of three independent plates with ten explants each. The experiment was repeated twice with similar results. Different letters indicate statistical differences at $P < 0.05$. Scale bars = 1 cm.

shoot junction to quantify root and shoot biomass. Treatments of 12 and 24 μM *N*-isobutyl decanamide significantly increased shoot fresh weight when compared to control plants, while concentrations of 48 and 60 μM decreased shoot biomass (Fig. 5D). Interestingly, the root system showed a different sensitivity to the shoot in its response to *N*-isobutyl decanamide. For instance, treatments of 12–36 μM *N*-isobutyl decanamide had a gradual increasing effect in root fresh weight when compared to the control and no significant decrease was recorded at 60 μM *N*-isobutyl decanamide, which was the greatest concentration tested of this compound (Fig. 5E).

3.4. Alkamides promote adventitious root formation on *A. thaliana* seedlings

Because a very clear increase of adventitious root number was registered in *A. thaliana* type I explants in response to *N*-isobutyl decanamide treatments, the effect of two alkamides, *N*-isobutyl-2*E*,6*Z*,8*E*-decatrienamide (affinin) and *N*-isobutyl decanamide, in adventitious root development was also monitored in seedlings that were germinated and grown for

18 d in agar plates with MS 0.2× medium supplied with increasing concentrations of the compounds. A general promoting effect of *N*-isobutyl decanamide treatment in adventitious root number was observed starting at a concentration of 36 μM. The most clear stimulating effect was recorded at higher concentrations (48 and 60 μM), for which a four- to sixfold increase in adventitious root number was recorded (Fig. 6A). The opposite effect was observed for adventitious root length (data not shown). Affinin was also found to increase adventitious root number in *A. thaliana* seedlings albeit at concentrations higher than 40 μM (Fig. 6B).

3.5. Effect of alkamides on auxin-inducible gene expression in shoot explants

The observed effect of alkamides on adventitious root formation is similar to that described for auxin in most plant species, including *A. thaliana*. Auxins such as indole-3-acetic acid (IAA) and 1-naphthalene acetic acid (NAA) increase adventitious root formation in nanomolar or low micromolar concentrations [16,17]. To test whether affinin and *N*-isobutyl

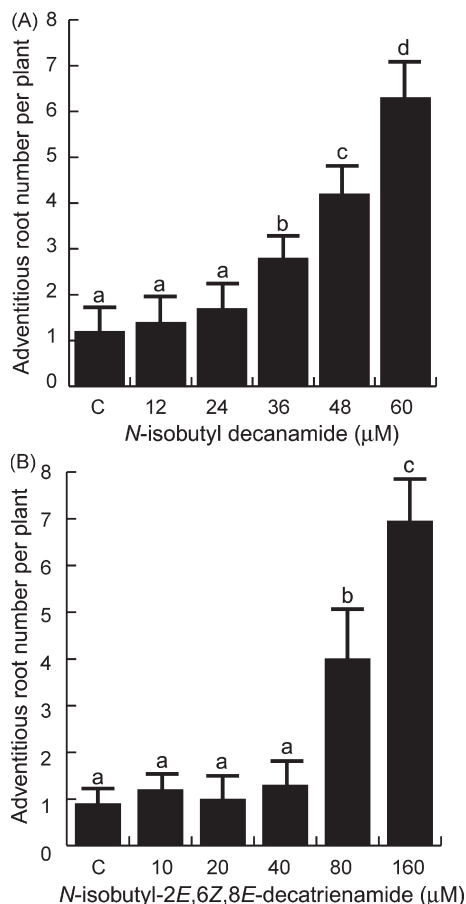


Fig. 6. Effect of alkamides on adventitious root development in *A. thaliana* (Col-0) seedlings. Plants were germinated and grown for 14 d under the indicated alkamide concentrations. (A) Number of adventitious roots per plant in *N*-isobutyl decanamide treatments. (B) Number of adventitious roots per plant in *N*-isobutyl-2E,6Z,8E-decatrienamide (affinin) treatments. Values shown represent the mean $\pm$ S.D. ($n = 30$). The experiment was replicated two times with similar results. Different letters indicate statistical differences at $P < 0.05$.

decanamide could alter auxin-regulated gene expression in shoot explants, and in this way promote adventitious root formation, we conducted analyses of the expression of the β -glucuronidase (GUS) reporter gene in explants from *Arabidopsis* transgenic seedlings harboring the *DR5:uidA* gene construct. This reporter line has been useful in studying auxin-regulated gene expression in *Arabidopsis* [11]. Fig. 7 shows histochemical staining for transgenic *DR5:uidA* explants that were transferred to NAA, affinin or *N*-isobutyl decanamide treatment and grown for 12 d. In solvent-treated control explants, *DR5:uidA* expression is absent from the hypocotyl section and is primarily located in the columella of developing adventitious roots (Fig. 7A and B). *DR5:uidA* explants grown in a concentration of 1 μ M IAA or 0.5 μ M NAA showed GUS activity throughout the stem and developing adventitious roots (Fig. 7C–F). In contrast, the pattern of GUS expression in *DR5:uidA* explants treated with a concentration of affinin or *N*-isobutyl decanamide that promotes adventitious root formation

remained similar to that observed in solvent-treated controls (Fig. 7G–J).

3.6. Alkamides induce adventitious root formation in auxin-signaling mutants

The result from *DR5:uidA* reporter expression analyses suggested that alkamide effects on adventitious root formation could not be related to auxin-altered responsive gene expression. To explore at the genetic level any potential role of the auxin-signaling pathway in mediating adventitious root formation induced by alkamides, we tested the effect of 24 μ M *N*-isobutyl decanamide on adventitious root formation of the *aux1-7*, *eir1-1*, *axr2-1* and *axr4-1* auxin mutants. As shown in Fig. 8, *N*-isobutyl decanamide treatment induced a two- to threefold increase in adventitious root number in WT explants compared with solvent-treated controls. In media lacking *N*-isobutyl decanamide, explants from *axr2-1*, *aux1-7* and *axr4-1* mutants displayed a small, not significant reduction in adventitious root number compared to WT explants. When explants from all four auxin-resistant mutants were cultured in medium with 24 μ M *N*-isobutyl decanamide, an increase in adventitious root formation was observed (Fig. 8). From these results, we conclude that explants from the auxin mutants are unaffected in *N*-isobutyl decanamide regulation of adventitious root formation.

3.7. *N*-Isobutyl decanamide increases endogenous nitric oxide in cultured *A. thaliana* shoot explants

Nitric oxide (NO) has been considered a signal involved in adventitious root development [18,19]. To further assess whether *N*-isobutyl decanamide could increase NO production and in this way promote adventitious root formation, we analyzed the presence of NO in explants by using the fluorescent probe DAF-2 DA. Living cells incorporate DAF-2 DA and subsequently, it is hydrolyzed by cytosolic esterases to release DAF-2, which reacts with NO to produce the fluorescent triazole derivative DAF-2T [20]. When *A. thaliana* hypocotyl explants transferred for 36 h to MS 0.2 $\times$ medium were loaded with DAF-2 DA, specific green fluorescence was observed in pericycle tissue close to the cutting zone (Fig. 9A and B). In explants that were transferred to 36 μ M *N*-isobutyl decanamide a very clear increase in fluorescence could be detected (Fig. 9C and D). In explants that were cultured for 14 d in *N*-isobutyl decanamide free medium, NO was absent from the stem and could be detected in developing adventitious roots (Fig. 9E and F). Interestingly, in *N*-isobutyl decanamide treated explants, increased formation of adventitious roots correlated with NO-specific fluorescence detected by the probe in explants, and thereafter, with increased NO levels within the stem and developing adventitious roots (Fig. 9G and H).

4. Discussion

In this study we evaluated the effects of *N*-isobutyl decanamide, a natural alkamide, in the morphogenetic responses of explants obtained from hypocotyls and roots of

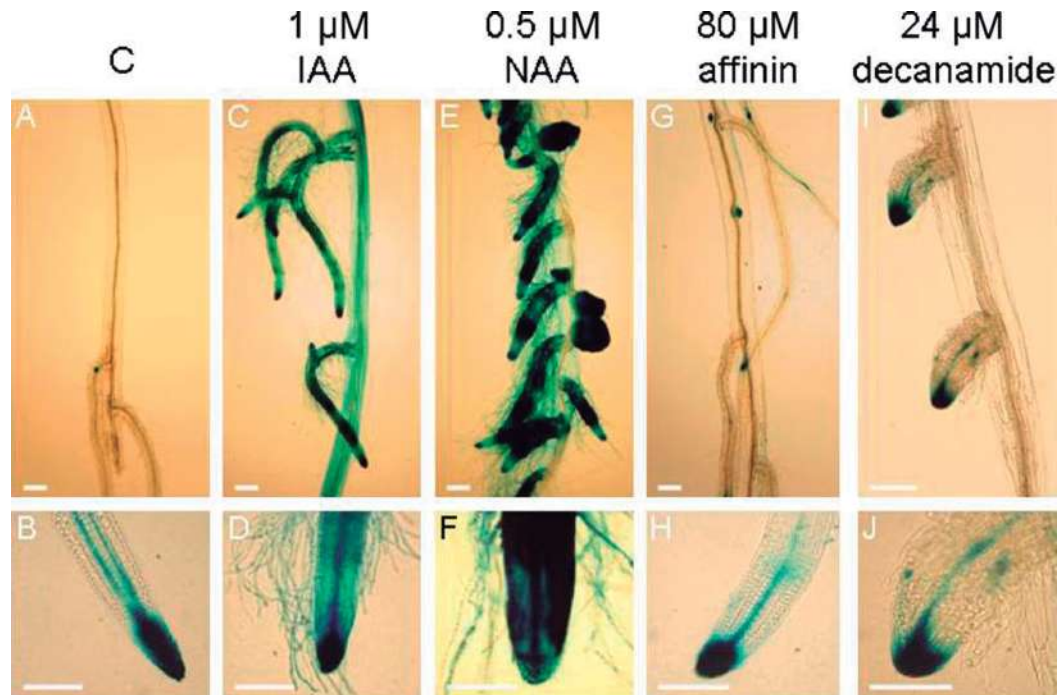


Fig. 7. Effect of alkamides on auxin-regulated gene expression. (A and B) Twelve hours of GUS staining of *DR5::uidA* type I explants grown for 14 d in medium without auxin, (C and D) under 1 μ M IAA, (E and F) 0.5 μ M NAA, (G and H) 80 μ M affinin or (I and J) 24 μ M *N*-isobutyl decanamide. Photographs are representative individual of at least 10 plants stained. Scale bar = 100 μ m.

dark grown *A. thaliana* seedlings. *N*-isobutyl decanamide was chosen from the alkamide group because of their saturation grade and medium length of the fatty acid chain, a characteristic shared by the most active NAEs [5–7,9].

Our results confirmed previous findings suggesting that alkamides possess plant growth promoting properties and report the effects for this class of compounds in the regulation of adventitious root formation. Previously, Ramírez-Chávez et al. showed that affinin, the major alkamide present in *H. longipes* roots increased the number of lateral roots in *A. thaliana*

seedlings. This effect was attributed to the dual activity of this compound to induce pericycle cells to divide and form new LRP, and to stimulate the emergence of existing LRP [8]. The effects of *N*-isobutyl decanamide in promoting lateral root emergence and increasing the number of total LRP in primary root explants (Figs. 2–4) suggest that both affinin and *N*-isobutyl decanamide may share common signaling mechanisms in regulating lateral root development. In later stages of development, *N*-isobutyl decanamide increased both shoot and root weights in plants regenerated from shoot explants, suggesting a positive effect of this alkamide in plant biomass production from tissue-cultured plants (Fig. 5).

Our results show that both *N*-isobutyl decanamide and affinin increased the number of adventitious roots in *A. thaliana* seedlings (Fig. 6). This suggests that alkamides can mimic the effect of an endogenous compound that play some role in the generation and development of adventitious roots. Adventitious root formation is a complex process affected by multiple endogenous factors, including phytohormones and environmental factors such as light and wounding. Lateral and adventitious roots are formed post embryonically. While lateral roots typically form from the root pericycle, adventitious roots form naturally from stem tissue [21–23]. The molecular mechanisms by which adventitious root formation is regulated are still poorly understood. Two candidate pathways emerge as potential targets of the alkamide signal: (i) the classic auxin pathway; accumulating pieces of physiological and genetic evidence have demonstrated a critical role of the plant regulator auxin, which is supplied by shoot tissues through the polar transport system, in the initiation of adventitious roots [16,17],

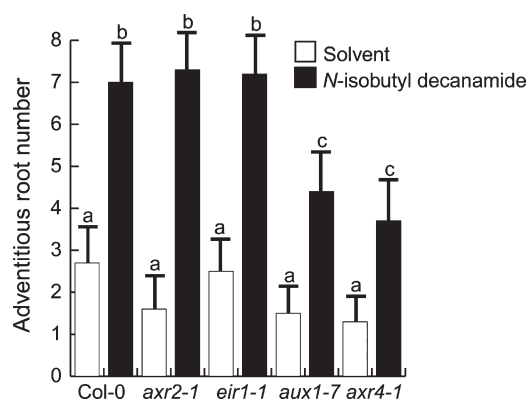


Fig. 8. Adventitious root response of wild-type (Col-0) and auxin-resistant mutants to *N*-isobutyl decanamide. Type I explants were obtained from all plant genotypes and grown for 14 d on MS 0.2 $\times$ medium with or without 24 μ M *N*-isobutyl decanamide. Values shown represent the mean adventitious root number per explant ($n = 30 \pm$ S.D.). Different letters are used to indicate means that differ significantly at the 0.05 level.

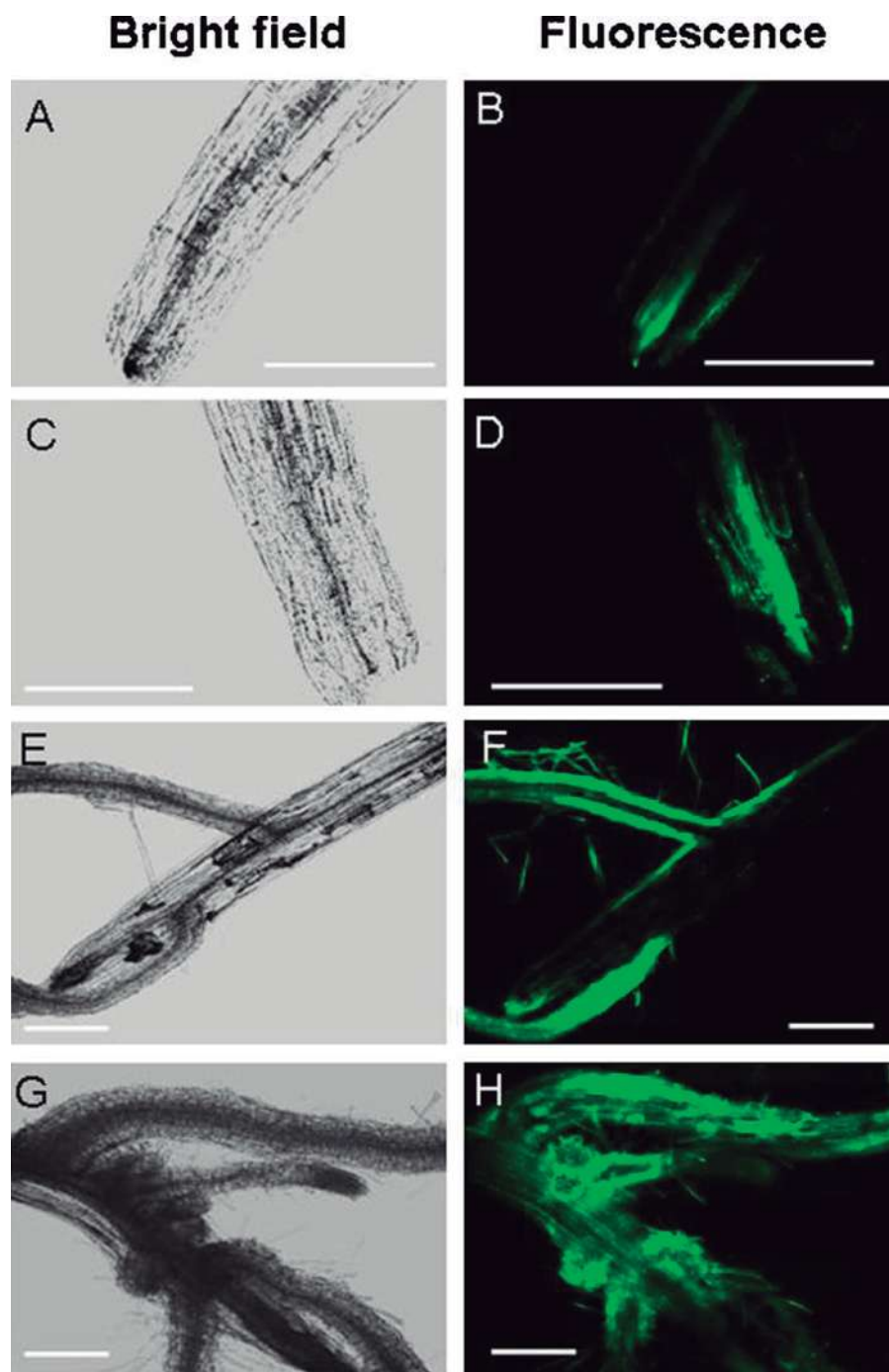


Fig. 9. Effect of *N*-isobutyl decanamide on NO accumulation in *A. thaliana* (Col-0) explants. (A and B) NO accumulation in type I explants grown for 36 h in medium without alkamide, or (C and D) under 36 μ M *N*-isobutyl decanamide. (E and F) NO accumulation in explants grown for 14 d in medium without alkamide, or (G and H) under 36 μ M *N*-isobutyl decanamide. Photographs are representative individuals of at least 10 DAF-DA loaded explants. Scale bars = 200 μ m.

or (ii) the nitric oxide (NO) response route; NO is a diffusible multifunctional molecule involved in numerous physiological processes in plants [24]. It was recently found to play a critical role in adventitious root formation acting downstream of the auxin pathway [18,19]. The target molecules of both auxin and NO in the shoot response to generate adventitious roots are still unknown.

Our results show that auxin might be not involved in the root architectural responses of *A. thaliana* seedlings to alkamides. This hypothesis is mainly based on two lines of evidence: expression studies of the auxin-inducible marker *DR5:uidA* and the WT induction of adventitious roots in the auxin-resistant mutants *axr2-1*, *aux1-7*, *eir1-1* and *axr4-1* when grown in a stimulating concentration of *N*-isobutyl decanamide. In these

experiments, treatment with 1 μM IAA or 0.5 μM NAA induced *DR5::uid* expression in shoot explants, whereas concentrations up to 24 μM of *N*-isobutyl decanamide or 80 μM affinin failed to induce this auxin-inducible gene marker (Fig. 7). The adventitious root response of all four tested auxin-resistant mutants was equally sensitive to affinin than WT plants (Fig. 8), indicating that the root developmental effects induced by alkamides are not mediated by the known auxin-signaling pathway.

The relationship between NO and alkamides was also investigated in *A. thaliana* shoot explants. We showed that *N*-isobutyl decanamide is able to induce NO accumulation in different stages of development of the explants. NO was detected by confocal microscopic analysis in the sites of adventitious root formation and its level increased with alkamide treatment (Fig. 9). Whether NO mediates the adventitious root response and other morphogenetic responses of plants to alkamides remain to be investigated.

Adventitious root formation has many practical implications in horticulture and agronomy and there is a lot of commercial interest because of the many plant species for which it is difficult to induce rooting [25]. It would be also of interest to evaluate the rooting efficiency of different alkamides in horticulturally important species. We are currently involved in the isolation of alkamide-resistant *A. thaliana* mutants to clarify the genetic mechanisms involved in alkamide perception and their interactions with other plant signals.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México, grant no. 43978) and the Consejo de la Investigación Científica (UMSNH, México, grant no. CIC 2.26). We thank Enrique Ramírez-Chávez and Jorge Molina-Torres for kind donation of alkamides. We gratefully acknowledge Cristina Reynaga-Peña, Alejandra Chacón and the microscopy facility of CINVESTAV, U. Irapuato, for advise and permission to use an Olympus confocal microscope.

References

- [1] J. Weyers, N. Paterson, Plant hormones and the control of physiological processes, *New Phytol.* 152 (2001) 375–407.
- [2] A. Cruz-Ramírez, J. López-Bucio, J. Ramírez-Pimentel, A. Zurita-Silva, L. Sánchez-Calderón, E. Ramírez-Chávez, E. González-Ortega, L. Herrera-Estrella, The *xip1* mutant of *Arabidopsis* reveals a critical role for phospholipid metabolism in root system development and epidermal cell integrity, *Plant Cell* 16 (2004) 2020–2034.
- [3] X. Wang, Lipid signaling, *Curr. Opin. Plant Biol.* 7 (2004) 329–336.
- [4] H.H. Schmid, P.C. Schmid, V. Natarajan, The *N*-acylation-phosphodiesterase pathway and cell signaling, *Chem. Phys. Lipids* 80 (1996) 133–142.
- [5] E.B. Blancaflor, G. Hou, K.D. Chapman, Elevated levels of *N*-lauroyl-ethanolamide, and endogenous constituent of desiccated seeds, disrupt normal root development in *Arabidopsis thaliana* seedlings, *Planta* 217 (2003) 206–217.
- [6] K.D. Chapman, Occurrence, metabolism, and prospective functions of *N*-acyl ethanolamides in plants, *Prog. Lipids Res.* 43 (2004) 309–327.
- [7] Y.S. Wang, R. Shrestha, A. Kilaru, W. Wiant, B.J. Venables, K.D. Chapman, E. Blancaflor, Manipulation of *Arabidopsis* fatty acid amide hydrolase expression modifies plant growth and sensitivity to *N*-acyl ethanolamines, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006) 12197–12202.
- [8] E. Ramírez-Chávez, J. López-Bucio, L. Herrera-Estrella, J. Molina-Torres, Alkamides isolated from plants promote growth and alter root development in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 134 (2004) 1058–1068.
- [9] J. López-Bucio, G. Acevedo-Hernández, E. Ramírez-Chávez, J. Molina-Torres, L. Herrera-Estrella, Novel signals for plant development, *Curr. Opin. Plant Biol.* 9 (2006) 523–529.
- [10] K. Kanbe, H. Naganawa, M. Okamura, T. Sasaki, M. Hamada, Y. Okami, T. Takeuchi, Amidenin, a new plant growth regulating substance isolated from *Amycolatopsis* sp., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57 (1993) 1261–1263.
- [11] T. Ulmasov, J. Murfett, G. Hagen, T. Guilfoyle, Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements, *Plant Cell* 9 (1997) 1963–1971.
- [12] G. Roman, B. Lubarsky, J. Kieber, E. Rothenberg, J. Ecker, Genetic analysis of ethylene signal transduction in *Arabidopsis thaliana*: five novel mutant loci integrated into a stress response pathway, *Genetics* 139 (1995) 1393–1409.
- [13] F.B. Pickett, A.K. Wilson, M. Estelle, The *aux1* mutation of *Arabidopsis* confers both auxin and ethylene resistance, *Plant Physiol.* 94 (1990) 1462–1466.
- [14] L. Hobbie, M. Estelle, The *axr4* auxin resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* defines a gene important for root gravitropism and lateral root initiation, *Plant J.* 7 (1995) 211–220.
- [15] C. Timpte, A.K. Wilson, M. Estelle, The *axr2-1* mutation of *Arabidopsis thaliana* is a gain-of-function mutation that disrupts an early step in auxin response, *Genetics* 138 (1994) 1239–1249.
- [16] M. Konishi, M. Sugiyama, Genetic analysis of adventitious root formation with a novel series of temperature-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*, *Development* 130 (2003) 5637–5647.
- [17] C. Sorín, J.D. Bussell, I. Camus, K. Ljung, M. Kowalczyk, G. Geiss, H. McKhann, C. Garcion, H. Vaucheret, G. Sandberg, C. Bellini, Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require ARGONAUTE 1, *Plant Cell* 17 (2005) 1343–1359.
- [18] G.C. Pagnussat, M. Simontachi, S. Puntarulo, L. Lamattina, Nitric oxide is required for root organogenesis, *Plant Physiol.* 129 (2002) 954–956.
- [19] G.C. Pagnussat, M.C. Lanteri, L. Lamattina, Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process, *Plant Physiol.* 132 (2003) 1241–1248.
- [20] H. Kojima, N. Nakatsubo, K. Kikuchi, S. Kawahara, Y. Kirino, H. Nagoshi, Y. Hirata, T. Nagano, Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins, *Anal. Chem.* 70 (1998) 2446–2453.
- [21] J.E. Malamy, P. Benfey, Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*, *Development* 124 (1997) 33–44.
- [22] I. Casimiro, T. Beeckman, N. Graham, R. Bhalerao, H. Zhang, P. Casero, G. Sandberg, M.J. Bennett, Dissecting *Arabidopsis* lateral root formation, *Trends Plant Sci.* 8 (2003) 165–171.
- [23] J. López-Bucio, E. Hernández-Abreu, L. Sánchez-Calderón, A. Pérez-Torres, R.A. Rampey, B. Bartel, L. Herrera-Estrella, An auxin transport independent pathway is involved in phosphate stress-induced root architectural alterations in *Arabidopsis*: identification of BIG as a mediator of auxin in pericycle cell activation, *Plant Physiol.* 137 (2005) 681–691.
- [24] L. Lamattina, C. García-Mata, M. Graciano, G. Pagnussat, Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule, *Ann. Rev. Plant Biol.* 54 (2003) 109–136.
- [25] J. Ludwig-Mueller, A. Vertocnik, C. Town, Analysis of indole-3-butyric acid-induced adventitious root formation on *Arabidopsis* stem segments, *J. Exp. Bot.* 56 (2005) 2095–2105.

Distribución y funciones de la serotonina y la melatonina en las plantas

Ramón Pelagio-Flores, Elda Beltrán-Peña y José López-Bucio

La melatonina (*N*-acetil-5-metoxitriptamina) y la serotonina (5-hidroxitriptamina) son dos neuro-hormonas bien conocidas en mamíferos, en donde participan en la regulación de importantes procesos fisiológicos. En los últimos años se ha reportado que estos compuestos se encuentran presentes en un gran número de especies de plantas y con ello se han planteado investigaciones enfocadas a la elucidación de sus funciones en ellas.

Sin embargo, la información existente sobre este campo, hasta la fecha sigue siendo limitada. Aunque este tema representa una línea de investigación relativamente nueva, los pocos trabajos pioneros en dicho campo, ya comenzaron a aportar información valiosa sobre la presencia de estos compuestos en plantas y sus posibles funciones celulares.

Algunas de las funciones sugeridas incluyen su participación como antioxidantes, como promotores del crecimiento, en la coordinación de respuestas de fotoperiodo, en la regulación de la apoptosis en respuesta a condiciones ambientales extremas y en la protección contra radicales libres, entre otras. En este capítulo se presenta la información existente sobre la distribución de dichos compuestos en plantas y se discuten las perspectivas de investigación a futuro que contribuyan a resolver la pregunta de cuál es la función que desempeñan la serotonina y la melatonina en las plantas.

7.1 Introducción

La melatonina y la serotonina son dos monoaminas bien conocidas en humanos y en animales, que participan en la regulación de importantes procesos fisiológicos (Hardeland *et al.*, 1993; Yu y Reiter, 1993; Foulkes *et al.*, 1997). Estas sustancias actúan principalmente como hormonas y/o neurotransmisores y aunque fueron consideradas inicialmente exclusivas de mamíferos, parecen ser ubicuas en la naturaleza, incluyendo las plantas. Sin embargo, se desconoce cuál es su función fisiológica en estas últimas.

Desde el descubrimiento de la serotonina (Bowden *et al.*, 1954) y la melatonina (Dubbels *et al.*, 1995) en las plantas, se han realizado diversos estudios tendientes a elucidar su distribución y abundancia en las diferentes especies vegetales (Kolar *et al.*, 1995; Murch *et al.*, 1997; Manchester *et al.*, 2000; Roshchina, 2001; Chen *et al.*, 2003; Reiter *et al.*, 2007). Ambos compuestos se han encontrado en todos los tejidos, incluyendo hojas, tallos, raíces, flores, frutos y semillas. De igual manera, se han venido realizando estudios enfocados a aportar información para conocer cuál es la función de estos compuestos en el reino vegetal. Como resultado de estos estudios, ha sido posible sugerir una gran variedad de funciones en las cuales pueden estar participando la serotonina y la melatonina, por ejemplo: la coordinación

de respuestas fotoperiódicas, el control de la fisiología reproductiva, la regulación de la apoptosis inducida por condiciones ambientales adversas, la detoxificación de radicales libres y la regulación del crecimiento y desarrollo. Siendo estas últimas las mayormente sustentadas experimentalmente (Csaba y Pal, 1982; Odjakova y Hadjiivanova, 1997; Kolar *et al.*, 1997; Murch *et al.*, 2001; Wolf *et al.*, 2001; Roshchina, 2001; Murch y Saxena, 2002a; Hernández-Ruiz *et al.*, 2004). Sin embargo los mecanismos por los cuales se llevan a cabo dichas funciones aún se desconocen.

La melatonina y la serotonina son dos compuestos indólicos que se encuentran presentes de manera natural en las plantas, en donde se sintetizan a partir del triptófano (Murch *et al.*, 2000), el cual es también precursor del ácido indol acético (AIA), una de las hormonas de mayor importancia en el crecimiento y desarrollo de las plantas. El AIA es considerado como la principal auxina natural presente en las plantas y es el metabolito proveniente del triptófano mejor caracterizado (Woodward y Bartel, 2005). La melatonina y la serotonina son compuestos estructuralmente relacionados al AIA y poseen características químicas similares (**Figura 7.1**). Las plantas tienen la capacidad de absorber los compuestos indólicos del medio de crecimiento, incluyendo a las auxinas en sistemas de transporte y transportarlos a sus diferentes tejidos. Se ha planteado que la serotonina y la melatonina podrían actuar de manera similar al AIA en la regulación de procesos fisiológicos e incluso utilizar los mismos sistemas de transporte de auxinas (Tan *et al.*, 2007a, b), aunque esto no se ha determinado experimentalmente.

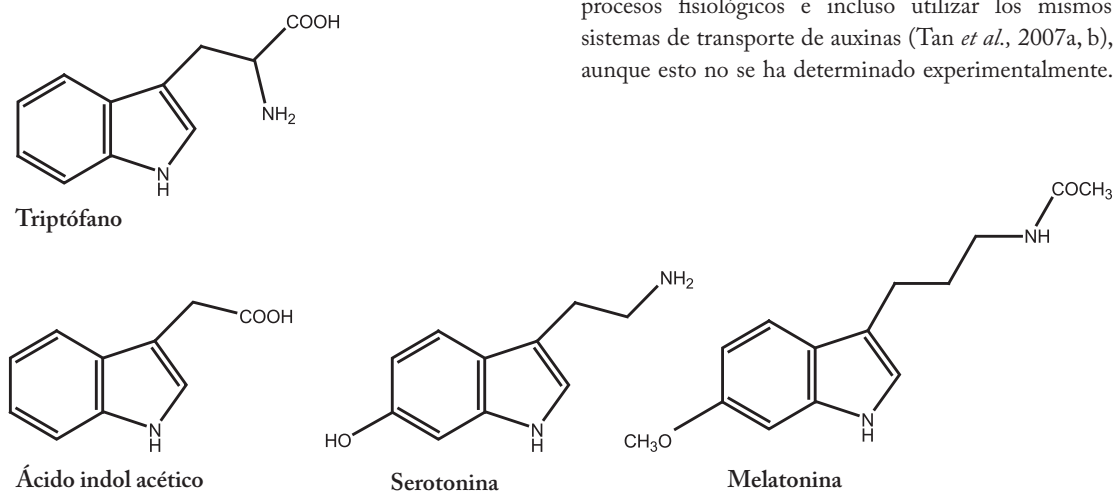


Figura 6.1. Similitud estructural del triptófano, ácido indol acético, serotonina y melatonina.

En la búsqueda de su función en las plantas, los primeros estudios al respecto estuvieron enfocados en la investigación de posibles funciones análogas a las que estos compuestos llevan a cabo en mamíferos. Por ejemplo, se encontró que la melatonina puede estar implicada en la coordinación del fotoperiodo y el ritmo circadiano, como ocurre en los animales (Balzer y Hardeland, 1996; Kolar *et al.*, 1999; Kolar y Machackova, 2001; Machackova y Krekule, 2002). Además de estas funciones, también se ha encontrado que la melatonina actúa como un antioxidante y agente protector, ya que su concentración aumenta considerablemente en hojas de plantas expuestas a condiciones de alta intensidad de luz ultravioleta. (Tettamanti *et al.*, 2000; Afreen *et al.*, 2006), o con picos de acumulación durante la fase luminosa en ciclos de luz-oscuridad (Tan *et al.*, 2007a). Lo antes mencionado sugiere una función importante de la melatonina como atrapador de radicales libres, protegiendo así a la planta contra el estrés oxidativo reduciendo el daño de macromoléculas (Tan *et al.*, 2007a). Otra de las funciones sugeridas, que sin duda resulta de mayor interés por su potencial biotecnológico, es su actividad en la regulación del crecimiento y desarrollo vegetal, incluso la melatonina ha sido considerada como un compuesto con actividad auxínica similar al AIA (Hernández-Ruiz *et al.*, 2004, 2005; Afreen *et al.*, 2006; Arnao y Hernández-Ruiz, 2006, 2007; Chen *et al.*, 2008; Posmyk *et al.*, 2008). Al ser el AIA uno de los reguladores del crecimiento y desarrollo más importantes por su participación en un gran número de procesos fisiológicos, resulta relevante investigar los efectos de la serotonina y melatonina sobre el crecimiento y productividad vegetal. A continuación se presenta y se discute la información existente sobre la actividad de la serotonina y la melatonina en relación a su posible papel como antioxidantes y sustancias promotoras del crecimiento.

7.2 Funciones de la serotonina y la melatonina en animales

La serotonina y la melatonina son dos monoaminas conocidas principalmente por su presencia en los animales, desde los nemátodos hasta los mamíferos en

donde participan en importantes procesos fisiológicos. La melatonina se conoce como un modulador biológico del humor, el sueño, el comportamiento sexual y es un mediador del ritmo circadiano. Recientemente, se ha reportado que esta molécula también actúa como anti-inflamatorio, inmunomodulador y en respuestas anticancerígenas y antitumorales (Reiter, 1993; Reiter *et al.*, 2007; Hardeland, 2006). En mamíferos, la melatonina es secretada principalmente por la glándula pineal, aunque también es producida en otros tejidos. Otras funciones atribuidas a la melatonina son la de interactuar con el citoesqueleto para modular procesos celulares y la de molécula antioxidante (Hardeland y Rodríguez, 1995; Reiter, 2000). Esto último debido a su capacidad para interactuar con radicales libres como son las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, incluidos el óxido nítrico, el peróxido de hidrógeno y el anión peroxinitrito. Por otra parte, la serotonina (5-hidroxytriptamina) es un neurotransmisor ampliamente estudiado, que regula el humor, el sueño, la ansiedad, e incluso la propensión al alcoholismo en los humanos (Veenstra-Vander Weele *et al.*, 2000). Esta molécula se sintetiza en las neuronas serotoninérgicas del sistema nervioso central y en las células enterocromafines en el tracto gastrointestinal de animales y humanos. Al igual que la melatonina, la serotonina tiene la propiedad de interactuar con radicales libres, por lo que también es un compuesto con alta actividad antioxidante.

7.3 Distribución de la serotonina y la melatonina en las plantas

Las plantas son la principal fuente de alimento para los humanos. La identificación y cuantificación de serotonina y melatonina en las plantas tenía como objetivo inicial evaluar el contenido nutricional y el impacto del consumo de estos compuestos en el alimento (Hattori *et al.*, 1995). Por esta razón, los primeros estudios para determinar la presencia de serotonina y melatonina se realizaron en especies hortícolas como el jitomate y la lechuga y en frutales como el plátano y la piña (Bowden *et al.*, 1954; Dubbels *et al.*, 1995). La serotonina se ha encontrado en más de 42 especies de

Tabla 7.1. Distribución de la melatonina en las plantas.

Familia	Nombre Científico	Nombre Comun	Referencia
Aliaceae	<i>Allium cepa</i> L.	Cebolla	Hattori <i>et al.</i> , 1995; Badria, 2002
	<i>Allium fistulosum</i> L.	Cebolla Welsh	Hattori <i>et al.</i> , 1995
	<i>Allium sativum</i> L.	Ajo	Badria, 2002
Araceae	<i>Colocasia esculenta</i> (L.) Schott	Taro	Hattori <i>et al.</i> , 1995
Asparagaceae	<i>Asparagus officinalis</i> L.	Espárragos	Hattori <i>et al.</i> , 1995
Bromeliaceae	<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr.	Piña	Hattori <i>et al.</i> , 1995; Badria, 2002
Musaceae	<i>Musa ensete</i> J. F. Gmel.	Plátano	Badria, 2002
	<i>Musa sapientum</i> L.	Plátano	Dubbels <i>et al.</i> , 1995
Poaceae (Gramineae)	<i>Avena sativa</i> L.	Avena	Hattori <i>et al.</i> , 1995; Hernández-Ruiz <i>et al.</i> , 2005
	<i>Festuca arundinacea</i> Schreb	Festuca alta	Hattori <i>et al.</i> , 1995
	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Cebada	Hattori <i>et al.</i> , 1995; Badria, 2002
	<i>Oryza sativa</i> L.	Arroz	Hernández-Ruiz <i>et al.</i> , 2005; Arnao y Hernández-Ruiz, 2008
	<i>Phalaris canariensis</i> L.	Alpiste	Hattori <i>et al.</i> , 1995; Badria, 2002; Hernández-Ruiz <i>et al.</i> , 2005
	<i>Triticum aestivum</i> L.	Trigo	Hernández-Ruiz <i>et al.</i> , 2005
	<i>Zea mays</i> L.	Maíz	Hattori <i>et al.</i> , 1995; Badria, 2002
Pontederiaceae	<i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.) Solms	Jacinto	Tan <i>et al.</i> , 2007
Ruscaceae	<i>Ophiopogon japonicus</i> (L. f.) Ker Gawler	Césped mondo	Chen <i>et al.</i> , 2003
Zingiberaceae	<i>Curcuma aeruginosa</i> Roxb.	Erzhu	Chen <i>et al.</i> , 2003
	<i>Elettaria cardamomum</i> (L.) Maton	Cardamos verde	Manchester <i>et al.</i> , 2000
	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Jengibre	Hattori <i>et al.</i> , 1995; Badria, 2002; Pape y Lu ning, 2006

plantas (Roshchina, 2001). Los frutos y las semillas son los principales tejidos en los que se acumula la serotonina, aunque su contenido varía mucho entre cada especie y tejido, en un rango de entre 0.007 mg g⁻¹ en hojas frescas de lechuga hasta 2,000 mg g⁻¹ en semillas de *Griffonia simplicifolia* (Fellows y Bell, 1970). De igual manera, la identificación y cuantificación de melatonina se ha realizado en una gran variedad de plantas (Tabla 7.1).

Mucha de la información generada sobre el contenido de estos compuestos, se ha recabado de familias de plantas importantes en términos de abundancia, valor e importancia económica (Reiter, 1999; Tettamanti *et al.*, 2000; Reiter *et al.*, 2007). Aunque los reportes de cuantificación de melatonina varían ampliamente de acuerdo a la especie estudiada, los niveles de melatonina reportados ocurren en el rango nanomolar

o micromolar (Murch *et al.*, 1997, 2004; Tettamanti *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2003). La variación en los niveles detectados de estos compuestos se atribuye a factores intrínsecos a la especie, las condiciones de crecimiento y la metodología utilizada en la determinación. La cuantificación de serotonina y melatonina se realiza mediante el uso de cromatografía líquida con detección electroquímica o fluorimétrica (Burkhardt *et al.*, 2001; Harumi y Matsushima, 2000; Hernández-Ruiz *et al.*, 2004, 2005; Hernández-Ruiz y Arnao, 2008). Aunque recientemente la cromatografía líquida en tándem con espectrometría de masas se ha encontrado que es más útil para la identificación de estos compuestos (Cao *et al.*, 2006), pero es un método más costoso.

Las técnicas inmunológicas utilizadas en animales para la determinación de serotonina y melatonina tales como RIA o ELISA han presentado serios problemas en plantas debido a que presentan reacciones cruzadas con otros co-extractos (Van Tassel y O'Neill, 2001; Pape y Lüning, 2006; Hardeland *et al.*, 2007). Esta observación ha planteado la necesidad de establecer nuevos métodos diferentes de extracción que implican la extracción directa de la muestra (DSE) o la extracción de homogenizado de muestra (HSE). La comparación de los métodos de extracción ha mostrado que el DSE es el método más apropiado (Arnao y Hernández-Ruiz, 2008b). Con el uso de métodos cada vez más sensibles y precisos, se vislumbra que en el futuro se incrementará nuestro conocimiento de los factores que afectan la acumulación de serotonina y melatonina en los diferentes tejidos vegetales, así como nuestro entendimiento respecto a la función de estos compuestos en las plantas.

7.4 Biosíntesis de la serotonina y melatonina

La serotonina y melatonina son derivados del triptófano al igual que el AIA. Las rutas biosintéticas del AIA en plantas, al igual que la de serotonina y melatonina en animales, han sido extensamente estudiadas. En plantas se ha establecido que la biosíntesis de AIA puede ocurrir a través de dos rutas principales, una dependiente y otra independiente de triptófano (Woodward y Bartel,

2005). En ambas rutas la mayoría de las enzimas que participan han sido identificadas y caracterizadas. Las rutas biosintéticas de serotonina y melatonina, así como las enzimas que participan en ellas también han sido identificadas y caracterizadas en tejidos animales de mamíferos (**Figura 7.2**; Arnao y Hernández-Ruiz, 2006). Sin embargo, en plantas la identificación y caracterización de las enzimas involucradas en dicho proceso aún requieren investigación. Existen evidencias que sugieren que las plantas cuentan con la maquinaria molecular para la síntesis de serotonina y melatonina. La triptófano descarboxilasa, una de las enzimas involucradas en la biosíntesis de melatonina en mamíferos, ha sido caracterizada en diferentes especies de plantas, entre las que se encuentran: *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Catharanthus roseus*, *Papaver somniferum* y otras especies. En *Hypericum perforatum* se acumulan grandes cantidades de serotonina y melatonina (Murch *et al.*, 1997). Esta planta ha sido utilizada como modelo para investigar una posible ruta de la síntesis de estos compuestos mediante estudios de incorporación de triptófano marcado, encontrando que este es incorporado dentro de algunos de sus metabolitos, entre ellos serotonina y melatonina (Murch *et al.*, 2000). Estos estudios reforzaron la idea de que las plantas cuentan con la maquinaria de síntesis requerida para la producción de dichos compuestos. Además de que en años recientes se han caracterizado las enzimas triptamina 5-hidroxilasa y triptófano descarboxilasa en plantas de arroz, ambas involucradas en la biosíntesis de serotonina y melatonina en plantas (Kang *et al.*, 2007a, b). Demostrándose así la ruta de síntesis de serotonina a través de estas dos enzimas, la triptófano descarboxilasa (TDC), que descarboxila al triptófano para convertirlo a triptamina y la triptamina hidroxilasa, que hidroxila a la triptamina para producir serotonina (Kang *et al.*, 2008).

7.5 Posibles funciones de la serotonina y melatonina en las plantas

Se han sugerido un gran número de funciones para la serotonina y la melatonina en plantas, pero sólo un número limitado de estudios se han enfocado en

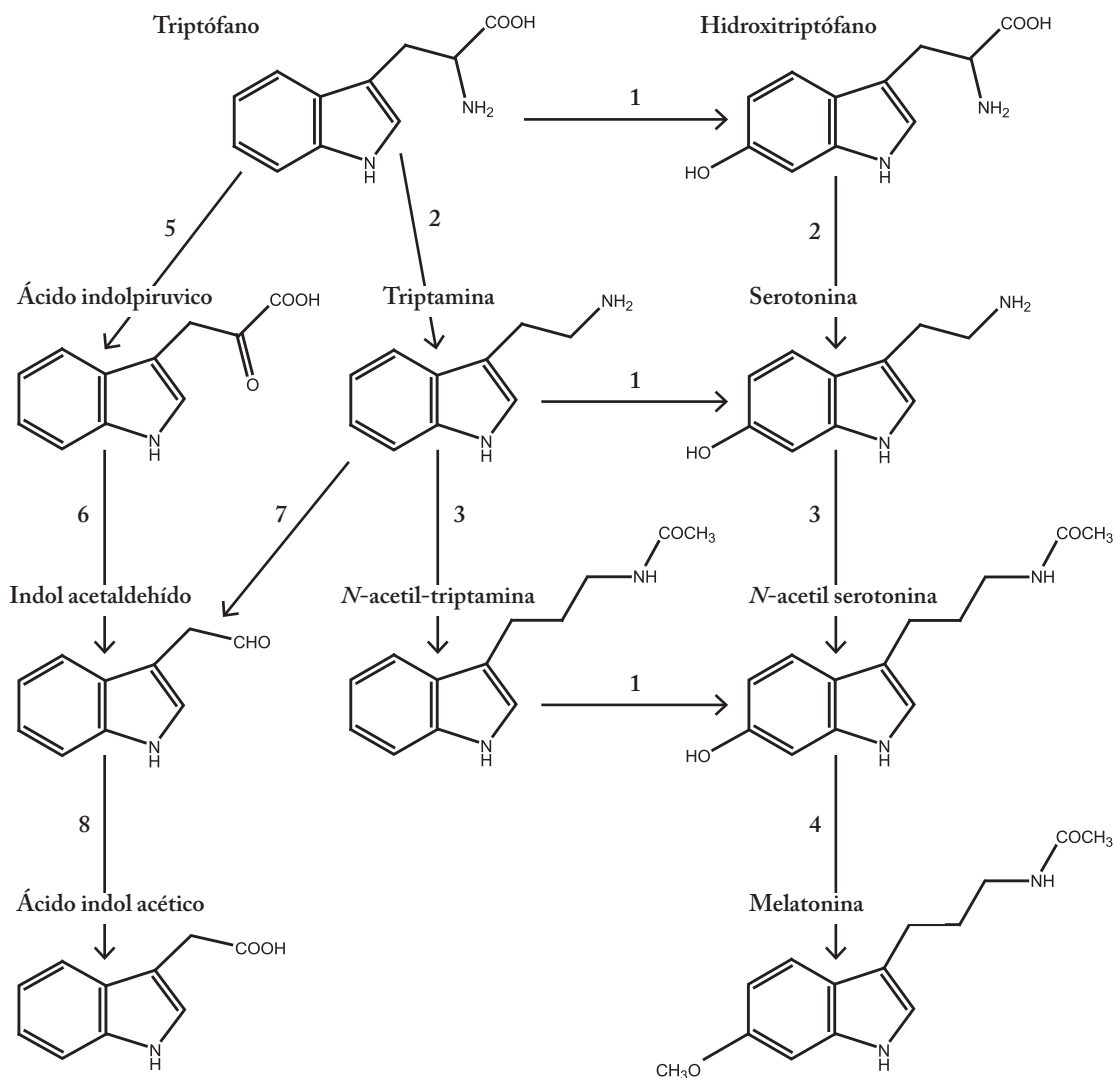


Figura 7.2. Rutas biosintéticas del AIA en plantas y de serotonina y melatonina en mamíferos. Los números indican las enzimas involucradas en cada paso de la síntesis: triptófano hidroxilasa (1), triptófano descarboxilasa (2), serotonina N-acetil transferasa (3), hidroxi-indol O-metiltransferasa (4), triptófano aminotransferasa (5), indol piruvato descarboxilasa (6), monoamina oxidasa (7), indol acetaldehído oxidasa (8) (Modificado de Arnao y Hernández-Ruiz 2006).

tratar de dilucidar cuál es el mecanismo de acción de estos compuestos en las plantas. Se ha propuesto que la serotonina actúa como un regulador del crecimiento, estimulando el crecimiento de las raíces (Csaba y Pal, 1982) y la germinación de las semillas (Roshchina, 2001). Otras funciones en que está implicada es la exudación de savia por las raíces, la floración, la

permeabilidad de iones y como un antioxidante (Odjakova y Hadjiivanova, 1997; Roshchina, 2001). En morfogénesis, la serotonina modula la organogénesis de la raíz inducida por auxinas a partir de explantes en *Hypericum Perforatum* L. (Murch *et al.*, 2001). Recientemente, también se describió la participación de la serotonina en el proceso de senescencia ya que

en plantas de arroz, ésta se acumula mayoritariamente en hojas senescentes, sugiriendo que puede estar participando en el mantenimiento de la integridad celular y así facilitar el reciclaje de los nutrientes de las hojas senescentes a los tejidos sanos (Kang *et al.*, 2007b, 2009a).

La función de la melatonina en las plantas al igual que para la serotonina no es del todo clara hasta la fecha, aunque desde su identificación en ellas, diferentes trabajos han llevado a cabo experimentos

cuyos resultados sugieren que este compuesto coordina respuestas fotoperiódicas, interactúa con reguladores de la fisiología reproductiva y funciona como estimulador del crecimiento (**Figura 7.3**).

Las funciones de la serotonina y melatonina con mayor soporte experimental son:

1. La respuesta a estrés mediante su actividad antioxidante.
2. Como estimuladores del crecimiento vegetal.

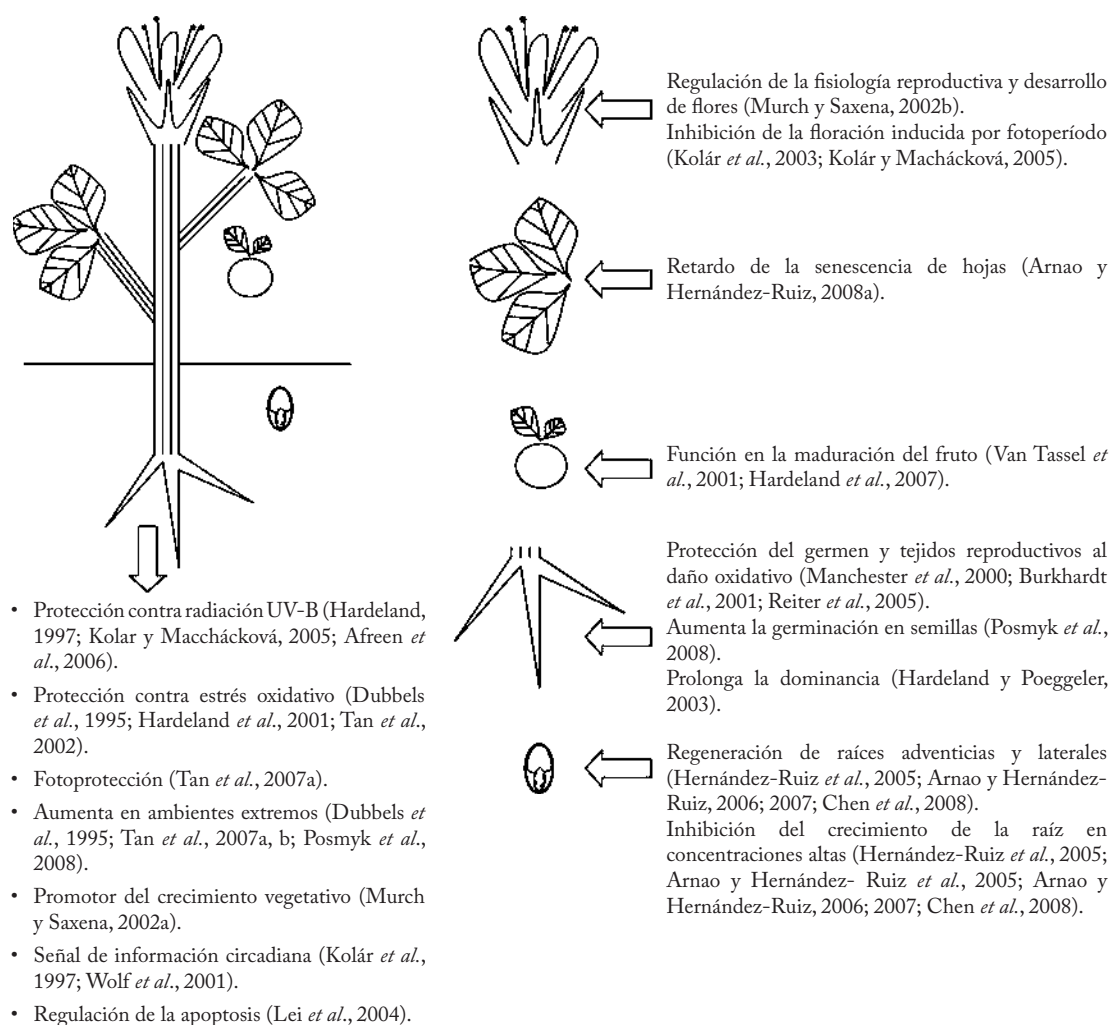


Figura 7.3. Funciones sugeridas para la melatonina en plantas. Se esquematizan las funciones en las que participa la melatonina en plantas, incluyendo las referencias respectivas (Modificado de Paredes *et al.*, 2008).

7.6 Respuestas a estrés

La capacidad de la melatonina de interactuar con radicales libres se ha descrito ampliamente en animales (Tan *et al.*, 2002). Dubbels *et al.*, (1995), cuantificaron el contenido de melatonina en tomate domesticado *Lycopersicon esculentum* Mill, y en tomate silvestre *Lycopersicon pimpinellifolium* (L) Mill, encontrando que esta última especie contiene 5 veces menos melatonina que la primera. Los autores relacionan esta característica con la tolerancia del tomate domesticado a niveles altos de ozono y propusieron que esta tolerancia podría explicarse por el papel antioxidante de la melatonina. En *Nicotiana tabacum* L. existen variedades que son diferencialmente sensibles al daño por ozono, siendo las variedades más resistentes las que poseen mayor contenido de melatonina en las hojas (Dubbels *et al.*, 1995). Estos resultados han permitido plantear que niveles altos de melatonina en la planta confieren protección contra el daño por ozono (Dubbels *et al.*, 1995; Badria, 2002). Por otra parte, se ha sugerido que la serotonina y melatonina podrían estar participando en el mantenimiento de la viabilidad de las semillas, ya que se ha observado una acumulación de serotonina en semillas de nuez que coincide con una mayor tolerancia al exceso de amonio y la desecación (Schroder *et al.*, 1999).

También se ha propuesto que la melatonina juega un papel importante en el desarrollo de la fruta y la semilla, esto como un mecanismo para aumentar la supervivencia y perpetuación de la especie (Van Tassel y O'Neill, 2001; Manchester *et al.*, 2000). Se especula que otra función fisiológica importante relacionada con la antioxidación, es la fotoprotección, ya que durante la fotosíntesis se generan altos niveles de radicales o especies reactivas de oxígeno incluyendo el peróxido de hidrógeno y el oxígeno elemental. Como se mencionó anteriormente, la melatonina confiere protección contra la exposición de las plantas a luz UV (Tan *et al.*, 2007a), lo que coincide con la observación de que las plantas expuestas en su hábitat natural a una alta intensidad de luz UV, contienen más melatonina que plantas de la misma especie expuestas a una baja intensidad luminosa (Tettamanti *et al.*, 2000). También se ha documentado que la radiación UV-B de mayor intensidad es más

efectiva que la de baja intensidad en estimular la acumulación de melatonina en *Glycyrrhiza uralensis* (Afreen *et al.*, 2006). Esta información sugiere que la radiación promueve la producción de melatonina, y que ésta protege a la planta de radicales libres u otras moléculas oxidantes resultado de la irradiación UV (Reiter y Tan, 2002; Kolar y Machácková, 2005). Estos resultados apoyan la idea que la serotonina y melatonina pueden ser utilizadas con fines agronómicos para protección contra condiciones de estrés o prevenir daños inducidos por estrés oxidativo a nivel celular (Hardeland *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2002). El estrés oxidativo en las plantas puede ser también inducido por contaminantes ambientales (Kolár y Manchácková, 2005), o por las condiciones ambientales adversas, climas extremadamente fríos, calientes o suelo y agua contaminados (Tan *et al.*, 2007a, b). El efecto antioxidante de la melatonina y serotonina podría conferir resistencia a estos tipos de agobio y su uso representaría una nueva alternativa en la fitorremediación (Tan *et al.*, 2002). Por ejemplo, uno de los estudios recientes que apunta en esa dirección es el publicado por Tan *et al.*, (2007b), el cual muestra que el suelo contaminado con cobre es letal para las semillas de chícharo (*Pisum sativum* L.). Sin embargo, cuando se adiciona melatonina, se aumenta significativamente la tolerancia de las semillas al metal contaminante y por lo tanto, la supervivencia de las plantas. En otro estudio similar, se reportó un efecto protector de la melatonina en la germinación de semillas y plantas jóvenes de col roja (*Brassica oleracea* L.) contra concentraciones tóxicas de cobre (Posmyk *et al.*, 2008). En este estudio, se observó que plántulas de semillas no tratadas con melatonina, crecidas en presencia de cobre, presentan un aumento en la peroxidación de lípidos, así como una inhibición en el crecimiento, afectando también la endoduplicación del DNA y la división celular, mientras que en plántulas tratadas con soluciones que contienen 1 y 10 μM de melatonina, el daño celular inducido por el cobre disminuye (Posmyk *et al.*, 2008). Tan *et al.*, (2007a) proponen que los altos niveles de melatonina en plantas de Jacinto están relacionados a una elevada capacidad antioxidante, lo cual puede explicar su alta tolerancia a los contaminantes inductores de estrés oxidativo. Por lo tanto, la melatonina probablemente participa en la adaptación al agobio ambiental causado por metales pesados o químicos tóxicos. En general se propone que

la acumulación de serotonina y/o melatonina en tejidos reproductivos, semillas y frutos, puede ser indicativo de un mecanismo para protegerlos del daño oxidativo que surge de sequía, frío, calor, luz UV o toxinas ambientales.

7.7 Regulación del crecimiento y desarrollo

Las plantas sintetizan una amplia variedad de compuestos como parte de su metabolismo entre los que se encuentran los reguladores del crecimiento como las auxinas, las citocininas, las giberelinas, el ácido abscísico y el etileno. Aunque estos han sido estudiados intensivamente durante las últimas dos décadas, cada vez es más evidente la existencia de nuevos compuestos con actividad biológica sobre procesos del crecimiento y desarrollo, incluyendo a la serotonina y melatonina. Por su similitud estructural con el AIA, se ha sugerido que la melatonina actúa como una auxina al promover el crecimiento vegetativo. Sin embargo, la organogénesis de raíz y de follaje inducida por auxinas y por citocininas respectivamente es inhibida por alteraciones en las concentraciones endógenas de serotonina y melatonina o mediante el uso de inhibidores del transporte de serotonina y melatonina (Murch *et al.*, 2001), indicando que estos compuestos podrían tener actividad antagónica a las auxinas (Murch y Saxena, 2002a). Hasta el momento existe información contradictoria sobre el mecanismo de acción de la serotonina y melatonina. En hipocótilos etiolados de *Lupinus albus*, tanto la melatonina como el AIA se encuentran distribuidos en un gradiente de concentración similar y ambos promueven activamente el crecimiento en concentraciones micromolares, pero en concentraciones mayores actúan como inhibidores (Hernández-Ruiz *et al.*, 2004). Cuando se elimina la zona de síntesis de AIA, las plantas presentan un crecimiento mínimo pero dicho efecto es revertido cuando a éstas se les adiciona AIA o melatonina. Los efectos sobre el crecimiento de los hipocótilos se atribuye a la estimulación de la expansión celular, papel en el cual puede estar actuando la melatonina junto con el AIA. En este sistema experimental, ambos compuestos también inducen la formación de

primordios de raíces, modificando así los patrones de distribución tanto de raíces adventicias como de raíces laterales (Arnao y Hernández-Ruiz, 2006). Este mismo grupo anteriormente reportó efectos similares en la estimulación del crecimiento en concentraciones bajas e inhibición en altas sobre *Triticum aestivum* L. (trigo), *Avena sativa* L. (avena), *Hordeum vulgare* L., y *Phalaris canariensis* L. (alpiste), atribuidos por los autores a la biosíntesis de etileno, la cual es inducida por auxinas. En particular, considerando como el 100% el efecto de estimulación del crecimiento de los coleóptilos el inducido por AIA, se tiene que la melatonina estimula el crecimiento en un 10% para avena, 20% para trigo, 32% para pasto, y 55% para cebada, proponiendo así a la melatonina como un compuesto con potencial actividad auxínica (Hernández-Ruiz *et al.*, 2005). Además ambos compuestos modifican de manera similar el crecimiento de la raíz (Hernández-Ruiz *et al.*, 2004, 2005). En otro trabajo se reporta a la melatonina como promotora del crecimiento vegetativo y del desarrollo de *Glycyrrhiza uralensis* en una manera dosis dependiente (Afreen *et al.*, 2006). Los autores mostraron evidencia de que la concentración de melatonina aumenta con el crecimiento de la planta, presentando valores de 4 veces o más en plantas de 6 meses que en plantas de 3 meses de edad. Además de lo antes mencionado, también encontraron que tanto las concentraciones de melatonina como el crecimiento de las plantas aumentan cuando son crecidas en condiciones de luz roja, sugiriendo una relación entre el crecimiento y desarrollo de la planta, la iluminación y la concentración de melatonina (Afreen *et al.*, 2006). En *Brassica juncea* (L.) Czern. (mostaza), se reportó que una concentración de melatonina de 0.1 μM presentó un efecto estimulador del crecimiento de la raíz y que una concentración de 100 μM presenta efectos inhibitorios. El efecto estimulador sólo se observa en plántulas jóvenes y estuvo asociado al incremento en los niveles endógenos de AIA libre. Por el contrario, las concentraciones altas no aumentaron significativamente el contenido endógeno de AIA a pesar de documentarse un efecto drástico en la inhibición del crecimiento de la raíz. Esta información sugiere que el efecto de la melatonina sobre el crecimiento de la raíz ocurre de manera independiente a la ruta de señalización del AIA (Chen *et al.*, 2008). Interesantemente, en explantes de hoja de *Echinacea purpurea*, las concentraciones de

serotonina y melatonina aumentan después del uso de inhibidores del transporte y acción de auxinas (Jones *et al.*, 2007). Además, el tratamiento con lidocaína, un bloqueador de canales de sodio, resulta en un aumento en los niveles de serotonina y melatonina pero no de AIA (Jones *et al.*, 2007). Por otra parte, Posmyk *et al.*, (2008) encontraron que un pretratamiento con melatonina aumenta la germinación de la semilla de *Brassica oleracea* rubrum L. en aproximadamente un 17% en agua y alrededor de 12 a 14% en la presencia de cobre. El crecimiento de las plántulas tratadas con 1 o 10 μM de melatonina fue también mayor que en los controles o en las semillas colocadas en agua destilada. Puesto que tanto la serotonina, como la melatonina y el ácido indol acético son compuestos estructuralmente relacionados a derivados indólicos, los autores sugieren la posibilidad que la aplicación de estos compuestos pueden ser metabolizados a ácido indol acético o a un agonista del ácido indol acético en el tejido de la planta, ya que en animales la melatonina puede ser convertida a ácido 5-metoxindol acético un compuesto que presenta baja actividad auxínica (Hardeland *et al.*, 1993; Katekar, 1997). Alternativamente, la melatonina podría actuar a través de la modulación de los niveles intracelulares de calcio (Ca^{2+}). Esta interacción representa un mecanismo potencial de señalización en plantas ya que diversas auxinas regulan respuestas fisiológicas mediante su interacción con el calcio y las proteínas que interactúan con el calcio.

7.8 Conclusiones y perspectivas

Si bien diversos estudios evidencian la presencia de serotonina y melatonina en las plantas, es un hecho que no se sabe que función desempeñan estos compuestos ni sus mecanismos de acción. Algunas de las funciones sugeridas en este trabajo, aunque apoyadas por evidencia experimental, han resultado a veces contradictorias, particularmente su actividad como reguladores del crecimiento vegetal. Esto plantea el reto de utilizar modelos de estudio para profundizar en los mecanismos moleculares que modulan la acción de estos compuestos, incluyendo a *Arabidopsis thaliana*.

El estudio de este grupo de compuestos ubicuos en la naturaleza abre nuevas perspectivas para su uso en aspectos biotecnológicos aplicados, en la agricultura y eventualmente, en el manejo de su producción en cultivos con fines nutrimentales en animales y humanos.

7.9 Referencias

- Afreen F., Zobayed S. M., Kozai T. 2006. Melatonin in *Glycyrrhiza uralensis*: response of plant roots to spectral quality of light and UV-B radiation. *J. Pineal Res.* 41: 108–115.
- Arnao M. B., Hernández-Ruiz J. 2006. The physiological function of melatonin in plants. *Plant Signal. Behav.* 1: 89–95.
- Arnao M. B., Hernández-Ruiz J. 2007. Melatonin promotes adventitious-and lateral root regeneration in etiolated hypocotyls of *Lupinus albus* L. *J. Pineal Res.* 42: 147–152.
- Arnao M. B., Hernández-Ruiz J. 2008a. Protective effect of melatonin against chlorophyll degradation during the senescence of barley leaves. *J. Pineal Res.* 10.1111/j.1600-079X.2008.00625.x.
- Arnao M. B., Hernández-Ruiz J. 2008b. Assessment of different sample processing procedures applied to the determination of melatonin in plants. *Phytochem. Anal.* 10.1002/pca.1083.
- Badria F. A. 2002. Melatonin, serotonin, and tryptamine in some Egyptian food and medicinal plants. *J Med. Food.* 5: 153–157.
- Balzer I., Hardeland R. 1996. Melatonin in algae and higher plants: possible new roles as a phytohormone and antioxidant. *Bot. Acta.* 109: 180–183.
- Bowden K., Brown B. G., Batty J. E. 1954. 5-Hydroxytryptamine: its occurrence in cowhage. *Nature.* 174: 925–926.
- Burkhardt S. Tan D. X., Manchester L. C., Hardeland R., Reiter R. J. 2001. Detection and quantification of the antioxidant melatonin in Montmorency and Balaton tart cherries (*Prunus cerasus*). *J. Agric. Food Chem.* 49: 4898–4902.
- Cao J., Murch S. J., O'Brien R., Saxena P. K. 2006. Rapid method for accurate analysis of melatonin,

- serotonin and auxin in plant samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chrom. Anal.* 1134: 333–337.
- Chen G., Huo Y., Tan D. X., Liang Z., Zhang W., Zhang Y. 2003. Melatonin in Chinese medicinal herbs. *Life Sciences*. 73: 19–26.
- Chen Q., Qi W. B., Reiter R. J., Wei W., Wang B. M. 2008. Exogenously applied melatonin stimulates root growth and raises endogenous indoleacetic acid in roots of etiolated seedlings of *Brassica juncea*. *J. Plant Physiol.* 166: 324–328.
- Csaba G., Pal K. 1982. Effect of insulin triiodothyronine and serotonin on plant seed development. *Protoplasma*. 110: 20–22
- Dubbels R., Reiter R. J., Klenke E., Goebel A., Schnakenberg E., Ehlers C., Schiwara H. W., Schloot W. 1995. Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Pineal Res.* 18: 28–31.
- Fellows L. E., Bell E. A. 1970. 5-Hydroxy-L-tryptophan, 5-hydroxytryptamine and L-tryptophan-5-hydroxylase in *Griffonia simplicifolia*. *Phytochem.* 9: 2389–2396
- Foulkes N. S., Borjigin J., Snyder S. H., Sassone-Corsi P. 1997. Rhythmic transcription: the molecular basis of circadian melatonin synthesis. *Trends Neurosci.* 20: 487–492
- Hardeland R., Reiter R. J., Poeggeler B., Tan D. X. 1993. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17: 347–357.
- Hardeland R., Rodríguez C. 1995. Versatile melatonin: a pervasive molecule serves various functions in signaling and protection. *Chronobiol Int.* 12: 157–165.
- Hardeland R., Poeggeler B. 2003. Non-vertebrate melatonin. *J. Pineal Res.* 34: 233–241.
- Hardeland R., Pandi-Perumal, S. R., Cardinali D. P. 2006. Molecules in focus: Melatonin. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 38: 313–316.
- Hardeland R., Fuhrberg B., Balzer I. 2001. Melatonin in plants: a mechanism of action in a unicellular alga and some perspectives of its role in multicellular plants. In: Hardeland R, ed. Actions and redox properties of melatonin and other aromatic amino acid metabolites. Cuvillier Verlag, 70–79.
- Hardeland R., Pandi-Perumal S. R., Poeggeler B. 2007. Melatonin in plants: focus on a vertebrate night hormone with cytoprotective properties. *Func. Plant Sci. Biotech.* 1: 32–45.
- Hardeland R. 1997. New actions of melatonin and their relevance to biometeorology. *Int. J. Biomet.* 41: 47–57.
- Harumi T. and Matsushima S. 2000. Separation and assay methods for melatonin and its precursors. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 747: 95–110.
- Hattori A., Migita H., Masayuki I., Itoh M., Yamamoto K., Ritsuki O. K., Hara M., Suzuki T., Reiter R. J. 1995. Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 35: 627–634.
- Hernández-Ruiz J., Arnao M. B. 2008. Melatonin stimulates the expansion of etiolated lupin cotyledons. *J. Plant Growth Regul.* 55: 29–34.
- Hernández-Ruiz J., Cano A., Arnao M. B. 2004. Melatonin: a growth stimulating compound present in lupin tissues. *Planta*. 220: 140–144.
- Hernández-Ruiz J., Cano A., Arnao M. B. 2005. Melatonin acts as a growth-stimulating compound in some monocot species. *J. Pineal Res.* 39: 137–142.
- Jones M. P., Cao J., O'Brien R., Murch S. J., Saxena P. K. 2007. The mode of action of thidiazuron: auxins, indoleamines, and ion channels in the regeneration of *Echinacea purpurea* L. *Plant Cell Rep.* 26: 1481–1490.
- Katekar G. F. 1997. Auxin: on the nature of the receptor site and molecular requirements for auxin activity. *Phytochem.* 18: 223–233.
- Kang S., Kang K., Lee K., Back K. 2007a. Characterization of tryptamine 5-hydroxylase and serotonin synthesis in rice plants. *Plant Cell Rep.* 26: 2009–2015
- Kang S., Kang K., Lee K., Back K. 2007b. Characterization of rice tryptophan decarboxylases and their direct involvement in serotonin biosynthesis in transgenic rice. *Planta*. 227: 263–272.
- Kang K., Kang S., Lee K., Park M., Back K. 2008. Enzymatic features of serotonin biosynthetic enzymes and serotonin biosynthesis in plants. *Plant*

- Signal Behav.* 3: 389–390
- Kang K., Kim Y. S., Park S., Back K. 2009. Senescence-induced serotonin biosynthesis and its role in delaying senescence in rice leaves. *Plant Physiol.* 135: 1380–1393
- Kolar J., Machácková I., Illnerova H., Prinsen E., van Dongen W., van Onckelen H. A. 1995. Melatonin in higher plant determined by radioimmunoassay and high performance liquid chromatography-mass spectrometry-mass spectrometry. *Biol. Rhythm. Res.* 26: 406–409
- Kolár J., Machácková I., Eder J., Prinsen E., Van Dogen W., Van Onckelen H., Illnerová H. 1997. Melatonin: occurrence and daily rhythm in *Chenopodium rubrum*. *Phytochem.* 44: 1407–1413.
- Kolár J., Johnson C. H., Machácková I. 1999. Presence and possible role of melatonin in a short-day flowering plant, *Chenopodium rubrum*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 460: 391–393.
- Kolár J., Machácková I. 2001. Occurrence and possible function of melatonin in plants. *Endocyt. Cell Res.* 14: 75–84.
- Kolár J., Johnson C. H., Machácková I. 2003. Exogenously applied melatonin (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine) affects flowering of the short-day plant *Chenopodium rubrum*. *Physiol. Plant.* 118: 605–612.
- Kolár J., Machácková I. 2005. Melatonin in higher plants: occurrence and possible functions. *J. Pineal Res.* 39: 333–341.
- Lei X. Y., Zhu R. Y., Zhang G. Y., Dai Y. R. 2004. Attenuation of cold-induced apoptosis by exogenous melatonin in carrot suspension cells: the possible involvement of polyamines. *J. Pineal Res.* 36: 126–131.
- Machácková I., Krekule J. 2002. Sixty-five years of searching for the signals that trigger flowering. *Russian J. Plant Physiol.* 49: 451–459.
- Manchester L. C., Tan D.X., Reiter R. J., Park W., Monis K., Qi W. 2000. High levels of melatonin in the seeds of edible plants: possible function in germ tissue protection. *Life Sciences.* 67: 3023–3029.
- Murch S. J., Simmons C. B., Saxena P. K. 1997. Melatonin in feverfew and other medicinal plants. *Lancet.* 350: 1598–1599.
- Murch S. J., Campbell S. S., Saxena P. K. 2001. The role of serotonin and melatonin in plant morphogenesis: regulation of auxin-induced root organogenesis in in vitro-cultured explants of St John's Wort (*Hypericum perforatum* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 37: 786–793.
- Murch S. J., Saxena P. K. 2002a. Melatonin: a potential regulator of plant growth and development? *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 38: 531–536.
- Murch S. J., Saxena P. K. 2002b. Mammalian neurohormones: potential significance in reproductive physiology of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.)? *Naturwiss.* 89: 555–560.
- Murch S. J., Krishna Raj S., Saxena P. K. 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 Rep.* 19: 698–704.
- Murch S. J., Rupasinghe H. P., Goodenowe D., Saxena P. K. 2004. A metabolomic analysis of medicinal diversity in Huang-qin (*Scutellaria baicalensis* Georgi) genotypes: discovery of novel compounds. *Plant Cell Rep.* 23: 419–425.
- Niaussat P., Laborit H., Dubolis C., Hiaussat M. 1958. Action of the serotonin sur la croissance des jeunes plantules d'Avoine. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 152: 945–947.
- Odjakova M., Hadjiivanova C. 1997. Animal neurotransmitter substances in plants. *Bulg. J. Plant Physiol.* 23: 94–102.
- Paredes S. D., Korkmaz A., Manchester L. C., Tan D. X., Reiter R. J. 2008. Phytomelatonin: a review. *J. Exp. Bot.* 60: 57–69.
- Pape C., Lüning K. 2006. Quantification of melatonin in phototrophic organisms. *J. Pineal Res.* 41: 157–165.
- Poeggeler B., Hardeland R. 1994. Detection and quantification of melatonin in a dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra*. Solutions to the problem of methoxyindole destruction in non-vertebrate material. *J. Pineal Res.* 17: 1–10.
- Posmyk M. M., Kuran H., Marciniak K., Janas K. M. 2008. Presowing seed treatment with melatonin protects red cabbage seedlings against toxic copper ion concentrations. *J. Pineal Res.* 45: 24–31.
- Reiter R. J., Tan D. X., Korkmaz A. 2007. Light at nights, chronodisruption, melatonin suppression,

- and cancer risk: A review. *Crit. Rev. Oncogen.* 13: 303–328.
- Reiter R. J. 1993. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia.* 49: 654–664.
- Reiter R. J. 1999. Phytochemicals: melatonin. In: Frances F. J., ed. Encyclopedia of food science and technology. New York: John Wiley. 1918–1922.
- Reiter R. J. 2000. Melatonin: Lowering the high price of free radicals. *News Physiol. Sci.* 15: 246–250.
- Reiter R. J., Tan D. X. 2002. Melatonin: an antioxidant in edible plants. *Ann. Acad. Sci.* 957: 341–344.
- Reiter R. J., Manchester L. C., Tan D. X. 2005. Melatonin in walnuts: influence on levels of melatonin and total antioxidant capacity of blood. *Nutrition.* 21: 920–924.
- Reiter R. J., Tan D. X., Manchester L. C., Simopoulos A. P., Maldonado M. D., Flores L. J. Terron M. P. 2007. Melatonin in edible plants (phytomelatonin): identification, concentrations, bioavailability and proposed functions. *World Rev. Nutr. Diet.* 97: 211–230.
- Roshchina V. V. 2001. Neurotransmitters in Plant Life. Science Publishers, Enfield, New Hampshire. 4–81.
- Schröder P., Abele C., Gohr P., Stuhlfauth-Roisch U., Grosse W. 1999. Latest on the enzymology of serotonin biosynthesis in walnut seeds. *Adv. Exp. Med. Biol.* 467: 637–644
- Tan D. X., Manchester L. C., Reiter R. J., Qi W. B., Karbownik M. Calvo J. R. 2000. Significance of melatonin in antioxidative defence system: reactions and products. *Biol. Sign. Recep.* 9: 137–159.
- Tan D. X., Manchester L. C., Di Mascio P., Martinez G. R., Prado F. M., Reiter R. J. 2007a. Novel rhythms of N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine and its precursor melatonin in water hyacinth: importance for phytoremediation. *FASEB J.* 2: 1724–1729.
- Tan D. X., Manchester L. C., Helton P. Reiter R. J. 2007b. Phytoremediative capacity of plants enriched with melatonin. *Plant Signal Behav.* 2: 514–516.
- Tan D. X., Reiter R. J., Manchester L. C., Yan M. T., El-Sawi M., Sainz R. M., Mayo J. C., Kohen R., Allegra M., Hardeland R. 2002. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr. Topics. Med. Chem.* 2: 181–197.
- Tettamanti C., Cerabolini B., Gerola P., Conti A. 2000. Melatonin identification in medicinal plants. *Acta Phytotherapeutica* 3: 137–144.
- Van Tassel D. L., O'Neill S. D. 2001. Putative regulatory molecules in plants: evaluating melatonin. *J. Pineal Res.* 31: 1–7.
- Veenstra-VanderWeele J., Anderson G. M., Cook E. H. 2000. Pharmacogenetics and the serotonin system: initial studies and future directions. *Eur. J. Pharmacol.* 410: 165–181.
- Wilkins M. B. 1984. Gravitropism. In MB Wilkins, ed, Advanced Plant Physiology. Pitman Publications Ltd., London, pp 163–185
- Wolf K., Kolár J., Witters E., Van Dogen W., Van Onckelen H., Machácková I. 2001. Daily profile of melatonin levels in *Chenopodium rubrum* L. depends on photoperiod. *J. Plant Physiol.* 158: 1491–1493.
- Woodward A. W., Bartel B. 2005. Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Ann. Bot.* 95: 707–735.
- Yu H. S., Reiter R. J. 1993. Melatonin: biosynthesis, physiological effects and clinical applications. Boca Ratón: CRC Press