



UNIVERSIDAD MICHUACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO
BIOLÓGICAS

“Participación del óxido nítrico en la regulación de la
arquitectura de la raíz y la respuesta a alcaloides en
Arabidopsis thaliana”

Tesis que presenta

Q.F.B. JAVIER RAYA GONZÁLEZ

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, Diego Raya y Arcelia González, les agradezco su apoyo, consejos y enseñanzas en la carrera de la vida, los amo.

A mis hermanos, Carmen, Ramón y José Carmen, saben que los quiero mucho y son mi gran inspiración

Al D.C. José López Bucio, quien es un ejemplo a seguir, le agradezco por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo para continuar con mi formación académica, por compartirme sus conocimientos, por su dedicación e interés, así como sus grandes consejos.

Al D.C. Eduardo Valencia Cantero, D.C. Alfredo Saavedra Molina, D.C. Homero Reyes de la Cruz y D.C. Jesús Campos García, por acceder amablemente a formar 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: Alina, Ami, Deya, Edith, Susi, Chava, Aaron, Randy, Hexon, Ramón, Kike, León, Poncho y Alejandro por brindarme su apoyo y amistad incondicional, así como los momentos agradables que pasamos.

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

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDO.	I
ÍNDICE DE FIGURAS.	IV
RESUMEN.	1
1. INTRODUCCIÓN.	3
2. ANTECEDENTES.	5
2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio.	5
2.2. La raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	5
2.3. Las raíces laterales.	7
2.4. Los pelos radiculares.	8
2.5. Los reguladores de crecimiento.	10
2.6. <i>Heliopsis longipes</i> .	11
2.7. Las alcamidas.	12
2.8. Las auxinas.	14
2.9. Óxido nítrico.	16
3. JUSTIFICACIÓN.	21
4. HIPÓTESIS.	21
5. OBJETIVOS.	22
5.1. Objetivo general.	22
5.2. Objetivos específicos.	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS.	23
6.1. Material Biológico.	23
6.2. Compuestos químicos.	23
6.3. Preparación de las semillas.	23

6.4. Condiciones de crecimiento.	24
6.5. Análisis de crecimiento.	24
6.6. Determinación de los estados de desarrollo de los primordios de raíces laterales.	25
6.7. Microscopía confocal.	26
6.8. Análisis histoquímico.	26
7. RESULTADOS.	27
7.1. Participación del óxido nítrico en procesos de diferenciación.	27
7.2. Los donadores de ON, SNP y SNAP activan procesos de iniciación y crecimiento de pelos radiculares en Arabidopsis.	28
7.3. El efecto inductor del SNP sobre pelos radiculares correlaciona con un incremento de los niveles de ON.	29
7.4. El SNP y SNAP inducen la expresión del marcador de diferenciación celular <i>AtEXP7:uidA</i> .	30
7.5. El donador de ON SNP estimula procesos de diferenciación celular en mutantes deficientes en la biosíntesis de ON, <i>Atnoa1</i> y <i>nia1 nia2</i> .	31
7.6. La <i>N</i> -isobutil decanamida induce cambios morfológicos en la raíz de Arabidopsis, acompañados por un incremento de los niveles de ON.	33
7.7. Los donadores de ON mimetizan los efectos de la <i>N</i> -isobutil decanamida en la arquitectura radicular de Arabidopsis.	35
7.8. El donador de ON, SNP activa la iniciación y el crecimiento de primordios de raíces laterales (PRL).	37
7.9. El ON inhibe el crecimiento de la raíz primaria de Arabidopsis sin comprometer la viabilidad celular.	38
7.10. La disminución de los niveles endógenos de ON afecta las respuestas de la <i>N</i> -isobutil decanamida en la raíz de	

Arabidopsis.	40
7.11. Genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis del ON determinan parcialmente la respuesta de <i>N</i> -isobutil decanamida en Arabidopsis.	42
7.12. La mutante resistente a alcanidas, <i>drr1</i> , mostró resistencia parcial a los efectos del donador de óxido nítrico, SNP sobre el desarrollo de raíces laterales.	44
7.13. El locus <i>DRR1</i> participa en el mecanismo de señalización del ON.	46
7.14. Las alcanidas y el ON actúan independiente o cascada abajo de la señalización por auxinas para inducir la formación de raíces laterales.	47
8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.	49
9. LITERATURA CITADA.	54
10. APÉNDICE.	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales reguladores del crecimiento vegetal.	4
Figura 2. Esquema representativo de la estructura celular de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	7
Figura 3. Cambios morfológicos durante el proceso de formación y desarrollo de raíces laterales.	8
Figura 4. Las alcamidas y su efecto sobre el sistema radicular de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	14
Figura 5. El óxido nítrico regula procesos relacionados con el desarrollo, crecimiento y respuestas adaptativas de las plantas.	20
Figura 6. Acumulación del ON en la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	28
Figura 7. Efecto de donadores de ON, SNP y SNAP sobre procesos de diferenciación.	29
Figura 8. El SNP y SNAP incrementan los niveles endógenos de ON y aumentan la expresión de genes asociados a diferenciación celular.	31
Figura 9. Efecto del SNP sobre procesos de diferenciación en mutantes de <i>Arabidopsis</i> afectadas en la biosíntesis de ON.	32
Figura 10. Efectos de la <i>N</i> -isobutil decanamida en la arquitectura radicular y sobre la acumulación de ON.	34
Figura 11. Efecto de los donadores de ON sobre la arquitectura radicular de <i>Arabidopsis</i> .	36
Figura 12. Efectos del ON sobre el crecimiento y formación de PRL.	38
Figura 13. Efectos de los niveles endógenos de ON en la viabilidad celular meristemática y en procesos de diferenciación celular.	40
Figura 14. Efecto de la disminución del ON endógeno sobre la arquitectura radicular en respuesta a <i>N</i> -isobutil	

decanamida.	42
Figura 15. Efectos de <i>N</i> -isobutil decanamida sobre la arquitectura radicular de mutantes de <i>Arabidopsis</i> afectadas en la biosíntesis de ON.	43
Figura 16. Efectos del ON sobre la arquitectura radicular de la mutante resistente a <i>N</i> -isobutil decanamida, <i>drr1</i> .	45
Figura 17. Niveles endógenos de ON en plántulas silvestres (Ws) y en la mutante <i>drr1</i> .	46
Figura 18. Efecto comparativo del AIA, SNP y <i>N</i> -isobutil decanamida sobre la arquitectura radicular y la expresión de marcadores de genes de respuesta a auxinas.	48
Figura 19. El óxido nítrico participa como un integrador de señales hormonales para la formación de raíces laterales en las plantas.	53

RESUMEN.

Las plantas son organismos que integran diversos estímulos ambientales para modular su crecimiento y desarrollo. Estos procesos están bajo el control de diferentes sustancias conocidas como reguladores del crecimiento. Recientemente, se ha descrito una clase novedosa de moléculas con un papel importante sobre el desarrollo de las plantas, que incluye a las alcanidas y el óxido nítrico (ON). Las alcanidas son moléculas lipídicas pequeñas distribuidas ampliamente en el reino vegetal, siendo la *N*-isobutil decanamida la alcanida con mayor actividad biológica descrita hasta la fecha. Por su parte, el óxido nítrico (ON) es un mensajero intracelular que regula una amplia gama de procesos fisiológicos y del desarrollo. En este trabajo se caracterizó el papel del ON sobre procesos de división, elongación y diferenciación celular y su participación en los cambios morfológicos inducidos por la *N*-isobutil decanamida sobre la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Primeramente, se analizaron los niveles endógenos de ON en las diferentes regiones de la raíz mediante microscopía confocal utilizando diacetato de fluoresceína (DAF-2DA), un compuesto fluorescente que interactúa específicamente con el ON, observándose que esta molécula se acumula en células de la cofia, en el meristemo apical, en los tricoblastos y en los pelos radiculares. Además, se encontró que la aplicación exógena de ON activa la formación y el crecimiento de los pelos radiculares, así como el aumento en la expresión de *EXP7*, un marcador de diferenciación celular en la raíz. La comparación de los efectos de la *N*-isobutil decanamida y los donadores de óxido nítrico SNP y SNAP sobre la arquitectura radicular, reveló que tanto la alcanida, como los dos donadores de ON regulan el sistema radicular de forma similar y de manera dosis dependiente, inhibiendo el crecimiento de la raíz primaria y estimulando la formación de primordios de raíces laterales (PRL). Los cambios inducidos por la *N*-isobutil decanamida sobre el sistema radicular correlacionan con el incremento de ON en la raíz primaria y en las raíces laterales. La inducción de primordios de raíces laterales por alcanidas disminuyó con la aplicación del agente oxidante de ON, cPTIO y en mutantes afectadas en la biosíntesis y

señalización del ON, *nia1 nia2* y *Atnoa1*, así como en la mutante resistente a alcalmidas, *drr1*. Las líneas mutantes *nia1 nia2* y *Atnoa1* presentaron la misma sensibilidad que plántulas silvestres en la inhibición del crecimiento de la raíz primaria. La mutante *drr1* mostró mayor tolerancia que plántulas silvestres en la inhibición del crecimiento de la raíz primaria y en la inducción de PRL en respuesta al ON. El análisis de la expresión de los marcadores *DR5:uidA* y *BA3:uidA* en respuesta a *N*-isobutil decanamida y ON, determinó que estas moléculas actúan de manera independiente o cascada abajo en la señalización por auxinas. En conjunto, nuestros resultados sugieren que el ON es un mensajero celular en la señalización por alcalmidas para regular los cambios morfogénéticos sobre el sistema radicular de *Arabidopsis*.

1. INTRODUCCIÓN.

Las plantas son organismos eucariontes, multicelulares de ciclo de vida sésil. De manera anatómica y fisiológica, podemos distinguir dos grandes sistemas de órganos, el follaje y la raíz. El follaje está constituido por las partes que crecen por encima del suelo tales como el tallo, las ramas, las flores, las hojas y los frutos. En las hojas es donde se lleva a cabo la fotosíntesis, principal proceso para la obtención de energía a través de la síntesis de carbohidratos. Por otro lado, el sistema radicular está formado por una raíz primaria, raíces laterales y adventicias y los pelos radiculares, estos órganos permiten el anclaje de la planta al suelo y facilitan la captación de agua y nutrientes, así como el establecimiento de interacciones bióticas y abióticas en la rizósfera. El desarrollo de las plantas está regulado por factores fisiológicos internos y señales ambientales, los cuales controlan la división, la expansión, la diferenciación y la muerte celular, afectando procesos como la germinación, la determinación de la arquitectura de la planta, la floración, la fructificación y la senescencia (Bishopp *et al.*, 2006). Las plantas producen compuestos de diferente identidad química que regulan un gran número de funciones celulares (Fig.1). Las auxinas, las citocininas, las giberelinas, el ácido abscísico y los brasinoesteroides representan diferentes clases de moléculas orgánicas, mientras que el etileno es un gas. Estos compuestos son considerados como reguladores del crecimiento o fitohormonas debido a su amplia presencia en las plantas y sus diversas funciones fisiológicas (Weyers y Patterson, 2001). Las funciones que regulan cada uno de los reguladores de crecimiento han sido elucidadas mediante su aplicación exógena en diferentes sistemas vegetales, manteniendo una correlación entre los niveles de la fitohormona y el desarrollo, o manipulando los niveles de los reguladores de crecimiento en plantas mutantes y transgénicas (Weyers y Patterson, 2001).

Recientemente, se han reportado nuevas moléculas con funciones novedosas en las plantas, como el óxido nítrico, un segundo mensajero muy bien caracterizado en animales, así como moléculas lipídicas de tamaño pequeño, las alcaloides. Estas moléculas son compuestos estructuralmente relacionados a las

N-aciletanolamidas (NAES) y *N*-acyl-L-homoserinas lactonas (AHLs), las cuales alteran el desarrollo de la raíz y regulan procesos de división y diferenciación celular en *Arabidopsis thaliana* (López-Bucio *et al.*, 2006; Ortíz-Castro *et al.*, 2008). Aunque el efecto de la aplicación exógena de alcaloides sobre el desarrollo vegetal ha sido ampliamente estudiado en nuestro grupo de trabajo (Ramírez-Chávez *et al.*, 2004; López-Bucio *et al.*, 2007; Campos-Cuevas *et al.*, 2008), poco se sabe sobre los mecanismos genéticos y moleculares que regulan las respuestas de las plantas a estos compuestos.

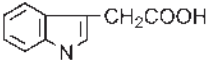
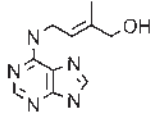
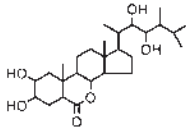
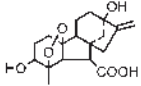
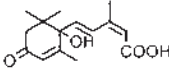
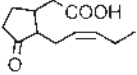
Reguladores del crecimiento	Estructura química	Funciones en la planta
Auxinas	 <p>Ácido indol acético</p>	Regulan respuestas tróficas a la luz y gravedad, la arquitectura general de la raíz y follaje, el desarrollo vascular y el crecimiento en cultivo de tejidos.
Citocininas	 <p>Cinetina</p>	Regulan la división celular, senescencia de la hoja, controlan la proliferación de las células madre en los meristemos, regulación de la acción de las auxinas
Brasinoesteroides	 <p>Brasinolido</p>	Regula la elongación y diferenciación celular, germinación de la semilla y tolerancia al estrés
Etileno	$H_2C=CH_2$ <p>Etileno</p>	Regula la senescencia de hojas y flores, la maduración de frutos y desencadena respuestas a factores de estrés externo y respuestas a patógenos
Giberelinas	 <p>Ácido giberélico</p>	Regula el crecimiento, en la germinación de la semilla, promueve la floración y el crecimiento del fruto
Ácido abscísico	 <p>Ácido abscísico</p>	Regula la dormancia y maduración de la semilla, tolerancia a sequía, respuestas de estrés y controla la apertura estomática
Ácido jasmónico	 <p>Ácido jasmónico</p>	Participa en las respuestas por hongos necrotrofos, respuestas anti-herbívora, producción de volátiles inducidos por herbivoría

Figura 1. Principales reguladores del crecimiento vegetal. Se describen los principales reguladores del crecimiento y sus funciones en las plantas (Modificado de Morquecho-Contreras y López-Bucio, 2010).

2. ANTECEDENTES.

2.1. *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio.

Muchos de los avances que actualmente existen en el conocimiento acerca de los mecanismos moleculares y bioquímicos que controlan el desarrollo de las plantas, se han realizado utilizando a *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis* es una planta que pertenece a la familia Brassicaceae, la cual tiene numerosas ventajas. En primer lugar, *Arabidopsis* es pequeña (30 cm) y fácil de manipular en el laboratorio, además, es posible generar mutantes en un tiempo muy corto (6-8 semanas). Existen bancos de semilla dedicados a generar mutantes de adquisición por catálogo mediante el tratamiento con sustancias químicas o radiaciones. *Arabidopsis* posee alrededor de 25,000 genes, que en conjunto comprende un genoma muy pequeño comparado con el de otras angiospermas, por lo que facilita los métodos de clonación para aislar los genes definidos por las mutaciones.

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

2.2. La raíz de *Arabidopsis thaliana*.

Desde una perspectiva del desarrollo, la raíz de *Arabidopsis* representa un modelo muy sencillo y adecuado para las investigaciones sobre procesos morfogénéticos. Un número pequeño de células madre generan todos los tipos celulares a través de divisiones estereotípicas seguidas de una expansión y diferenciación celular. Debido a que el crecimiento de la raíz es indeterminado, estos procesos son continuos. El crecimiento de la raíz primaria ocurre en el meristemo apical de la raíz (RAM, *root apical meristem*). El RAM produce células en dos direcciones, produce una capa de tejido llamado cofia, que abarca el extremo distal de las raíces. La cofia protege a la punta de la raíz a medida que crece a través del suelo. La cofia percibe y procesa los estímulos ambientales y

modula la dirección del crecimiento de la raíz en función de la gravedad (gravitropismo), luz (fototropismo), obstáculos (tigmotropismo), gradientes de temperatura (termotropismo), humedad (hidrotropismo), nutrientes y otras sustancias químicas (quimiotropismo) (Hasenstein y Evans 1988; Ishikawa y Evans 1990; Okada y Shimura, 1990).

El RAM también produce células que contribuyen a la estructura de la raíz. El sistema radicular es una estructura formada por diferentes tejidos celulares, la epidermis, el cortex, la endodermis, el periciclo y los haces vasculares (Fig. 2). Las células que forman los diferentes tejidos se producen a partir de cuatro células madre (células iniciales) localizadas en el ápice de la raíz (Dolan *et al.*, 1993). Internamente y en contacto con las células iniciales se encuentran un número pequeño de células llamado centro quiescente (QC, *quiescent center*) (Fig. 2). El centro quiescente presenta poca actividad mitótica, pero su función principal es la de mantener la organización de las células adyacentes. A medida que va creciendo la raíz, la zona de división celular (zona meristemática) dará paso a una fase de expansión celular que marca el final de la zona meristemática y el inicio de la zona de elongación. Una vez que incrementan su tamaño, las células se diferencian en su forma y función final, este proceso está evidenciado por la aparición de pelos radiculares, células epidérmicas especializadas en la captura de agua y nutrientes. Por otra parte, mediante eventos de división celular en el periciclo, se forman las raíces laterales, órganos que incrementan la superficie total de exploración del suelo y contribuyen con un mejor anclaje. A pesar del conocimiento que se tiene de los procesos morfológicos que se llevan a cabo en la raíz, poco se sabe acerca de los mecanismos celulares y moleculares que participan en la regulación del sistema radicular de las plantas.

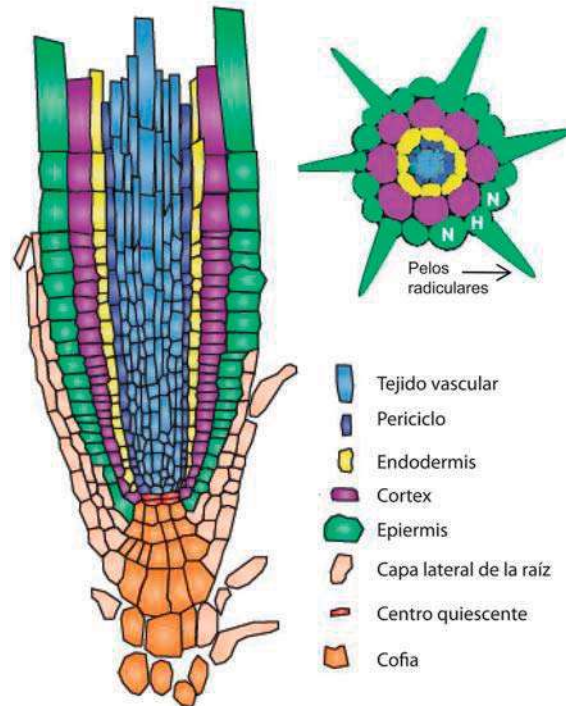


Figura 2. Esquema representativo de la estructura celular de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Se muestran cortes longitudinales y transversales de la raíz primaria indicándose los diferentes tejidos que la componen (Modificado de Jaillais y Chory, 2010).

2.3. Las raíces laterales.

Las plantas han adaptado su desarrollo post-embriionario en función de las señales internas (hormonas) o externas (ambientales). El sistema radicular, además de anclar la planta al suelo y establecer relaciones con los microorganismos de la rizósfera, también es responsable de adquirir agua y nutrientes. La mayor parte del sistema radicular está formado por raíces laterales (RL), originadas a partir de la raíz primaria. El desarrollo de RL está controlado por diferentes factores incluyendo la concentración de nutrientes dentro de la planta y en el suelo (López-Bucio *et al.*, 2003). Por lo tanto, las plantas han optimizado su desarrollo en función de las necesidades y son capaces de responder a cambios ambientales, modulando el desarrollo de RL o pelos radiculares a lo largo de la raíz primaria. Las RL de *Arabidopsis* se originan a partir de células del periciclo localizadas de manera opuesta a los polos del xilema (Dolan *et al.*, 1993). Estos órganos laterales se forman cuando células del periciclo se dividen, creando una capa celular de hasta 10 células de igual tamaño (estado I). Posteriormente, las

células se dividen periclinalmente, formando una segunda capa celular (estado II). Mas tarde, divisiones anticlinales y periclinales crean un primordio en forma de domo (estados del III-VII) que eventualmente penetra las diferentes capas celulares de la raíz hasta emerger en forma de raíz lateral (Fig. 2) (Malamy y Benfey, 1997).

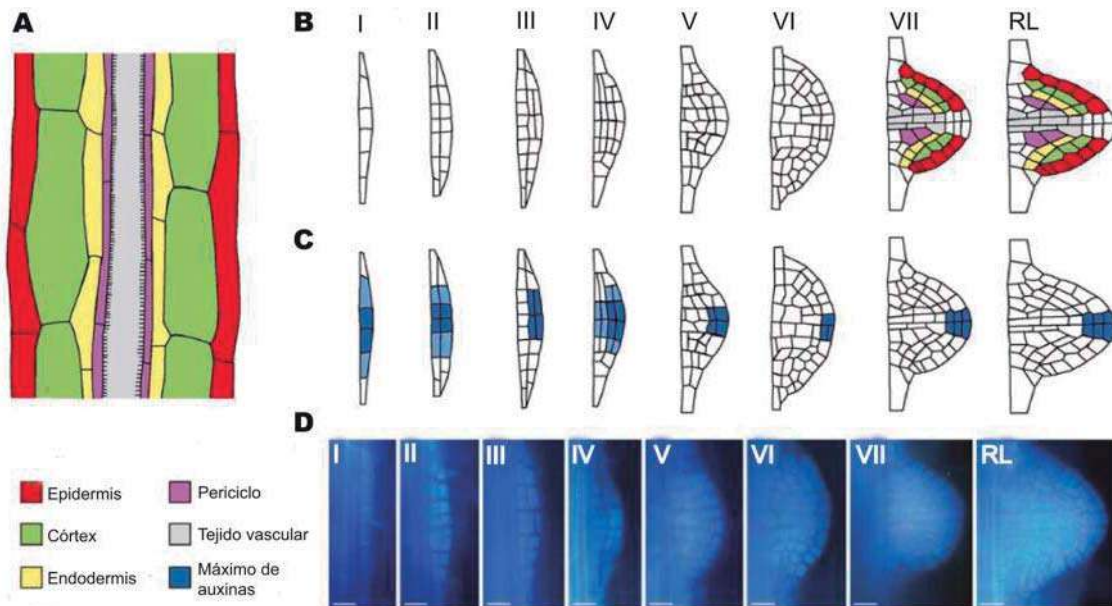


Figura 3. Cambios morfológicos durante el proceso de formación y desarrollo de raíces laterales. Las raíces laterales se originan de la raíz primaria a partir de células del periciclo (A). Los siete estados del desarrollo de PRL (en números romanos [Malamy y Benfey, 1997]) se muestra en (B) así como el establecimiento del máximo de auxinas, demostrado por el marcador *DR5:uidA* (gradiente azul) [D]. Las barras de escala representan 20 μm (Modificado de Péret *et al.*, 2009).

2.4. Los pelos radiculares.

Los pelos radiculares son estructuras de la raíz que resultan de la diferenciación de células epidérmicas. En *Arabidopsis* los pelos radiculares tienen aproximadamente 10 μm de diámetro y pueden llegar a medir 1 mm o más de longitud. Debido a que incrementan tanto el área superficial como el diámetro de la raíz, se considera que los pelos radiculares tienen como principal función la adquisición de nutrientes, el anclaje y la interacción con microorganismos (Hofer, 1991). Los pelos radiculares de *Arabidopsis* han estado bajo investigación intensa

debido a que proveen numerosas ventajas para el estudio básico del desarrollo vegetal. Estas estructuras crecen muy rápido a una velocidad aproximada de 1 $\mu\text{m}/\text{min}$, facilitando estudios de expansión celular, además de que estos no son esenciales para la viabilidad de la planta, lo cual permite el análisis de varios tipos de mutantes afectadas en el desarrollo de estas estructuras.

Durante el desarrollo de la raíz primaria surgen dos tipos celulares en la epidermis, las células que forman pelos radiculares (tricoblastos, células H) y las células que no forman pelos (atricoblastos, células N) (Fig. 2). La epidermis de la raíz de *Arabidopsis* se produce a partir de un grupo de 16 células iniciales durante la embriogénesis (Dolan *et al.*, 1993; Scheres *et al.*, 1994). En las células hijas ocurren divisiones transversales en la región meristemática de la raíz y esas divisiones sirven para generar células adicionales dentro de la misma fila (Baum y Rost, 1996; Berger *et al.*, 1998b). Además, ocasionalmente ocurren divisiones longitudinales anticlinales resultando en un incremento en el número de filas celulares.

Los estudios genéticos y moleculares realizados en *Arabidopsis* han definido un grupo de genes que se encuentran participando en el destino celular epidérmico, *WEREWOLF* (*WER*) el cual es un factor transcripcional tipo MYB, *TRANSPARENT TESTA GLABRA* (*TTG*), dos factores transcripcionales con estructura hélice vuelta hélice (b HLH), *GLABRA 3* (*GL3*) y *ENHANCER OF GLABRA* (*EGL3*) el cual reprime la diferenciación de las células epidérmicas (células N). Este complejo regula la expresión de *GLABRA 2* (*GL2*), el cual codifica un factor transcripcional homodominio y *CAPRICE* (*CPC*) que codifica una proteína MYB. La proteína CPC se mueve lateralmente a la célula epidérmica adyacente, donde esta inhibe la expresión de *WER* y *GL2* promoviendo así la diferenciación celular para la formación de pelos radiculares (células H) (Lee y Schiefelbein, 2002).

El etileno y las auxinas promueven la formación de pelos radiculares. El bloqueo de la percepción de etileno o la inhibición de la síntesis de etileno reduce el número de pelos radiculares, mientras que tratamientos con el precursor de etileno, el ácido carboxílico 1-aminociclopropano (ACC) se induce la formación

ectópica de pelos radiculares en las células N (Tanimoto *et al.*, 1995). Además del análisis farmacológico, estudios genéticos han demostrado que las auxinas regulan la formación de pelos radiculares (Masucci y Schiefelbein, 1994, Rahman *et al.*, 2002).

2.5. Los reguladores de crecimiento.

Debido a que las plantas presentan un estilo de vida sésil, desarrollaron la capacidad de responder a un gran número de estímulos externos para coordinar su crecimiento y desarrollo, mediante la síntesis de los diferentes reguladores de crecimiento, los cuales ejercen funciones mediante programas de señalización intracelular específicas que conducen al encendido o apagado de genes (del Pozo *et al.*, 2005). Los reguladores de crecimiento son un grupo de moléculas pequeñas derivadas de diferentes vías metabólicas (Fig. 1). Los reguladores de crecimiento clásicos identificados durante la primera mitad del siglo XX son las auxinas, las citocininas, las giberelinas, el ácido abscísico y el etileno. Más recientemente, varios compuestos han sido reconocidos como reguladores del crecimiento incluyendo brasinoesteroides, jasmonatos, el ácido salicílico, el óxido nítrico y las estrigolactonas (Santner y Estelle, 2009). Actualmente se acepta que los reguladores de crecimiento forman un grupo de moléculas integradoras de información, cuyas vías de señalización interactúan con frecuencia para regular la morfogénesis vegetal y las respuestas al ambiente (López-Bucio *et al.*, 2006).

Las reguladores de crecimiento ejercen sus efectos biológicos a concentraciones bajas y regulan diversos procesos celulares (Weyers y Patterson, 2001). Estos compuestos se pueden transportar entre los diferentes tejidos a través del sistema vascular (xilema y floema), como es el caso de las auxinas o mediante los espacios intercelulares como el etileno (Gray, 2004). Casi todos los aspectos del crecimiento vegetal están bajo control de los reguladores de crecimiento. Un solo regulador de crecimiento puede afectar una amplia gama de aspectos celulares y procesos sobre el desarrollo, mientras que por otro lado, un solo proceso puede ser influenciado, al mismo tiempo por múltiples reguladores de crecimiento (Gray, 2004).

En los últimos años se ha evidenciado la presencia en las plantas de compuestos con función reguladora, caracterizados previamente en los animales, que incluyen a las *N*-aciletanolamidas, el glutamato y el óxido nítrico. En particular, las *N*-aciletanolamidas son moléculas estructuralmente similares a las alcanidas, un grupo de moléculas pequeñas lipídicas compuestas por una cadena de ácido graso asociada a una amida. Aunque el efecto de la aplicación exógena de alcanidas sobre el desarrollo vegetal ha sido ampliamente estudiado en nuestro grupo de trabajo (Ramírez-Chávez *et al.*, 2004; López-Bucio *et al.*, 2007; Campos-Cuevas *et al.*, 2008), poco se sabe sobre los mecanismos genéticos y moleculares que regulan las respuestas de las plantas a estos compuestos. El óxido nítrico se ha descrito en animales como un segundo mensajero y regulador del factor de relajación derivado del endotelio en células del músculo liso (Ignarro *et al.*, 1987). Recientemente, el interés en el ON se ha incrementado para elucidar su función en las plantas, ya que se ha reportado que puede participar en diversos procesos fisiológicos del desarrollo que incluyen el crecimiento de la raíz primaria y la formación de raíces laterales (Correa-Aragunde *et al.*, 2006).

2.6. *Heliopsis longipes*.

Esta planta, mejor conocida como “chilcuague”, es una angiosperma utilizada como un recurso medicinal en el estado de Guanajuato. En la medicina popular se utiliza como analgésico, anestésico y antibiótico para infecciones del aparato respiratorio y digestivo. Esta planta acumula en su raíz una gran cantidad de compuestos lipídicos muy activos conocidos como alcanidas (García-Chávez *et al.*, 2004), y fue la primera especie en donde se reportó la presencia de una alcanida oleofínica, la afinina (Fig. 4). La afinina es un compuesto formado por un ácido graso con cadena de 10 carbonos con tres insaturaciones unido a una isobutilamida. La afinina pertenece al grupo de compuestos denominado alcanidas oleofínicas, que incluye alrededor de 70 diferentes moléculas con diferente longitud en la cadena del ácido graso y grado de saturación (Molina-Torres *et al.*, 1996). Una de las alcanidas con mayor actividad biológica descrita en plantas es la *N*-isobutil decanamida (decanamida). Esta sustancia se puede

obtener mediante reducción catalítica de la afinina y se caracteriza por tener una cadena de ácido graso saturada (Fig. 4B). La decanamida se encuentra en pequeñas concentraciones en diferentes especies vegetales provenientes de diferentes familias; sin embargo, se desconoce casi por completo la relevancia biológica de esta sustancia, el papel que desempeña en la fisiología de las plantas y sus mecanismos de acción sobre el desarrollo vegetal.

2.7. Las alcanidas.

Las alcanidas se consideraron inicialmente metabolitos secundarios que comprenden más de 200 compuestos relacionados y distribuidos ampliamente en las plantas (López-Bucio *et al.*, 2006; Morquecho-Contreras y López-Bucio, 2007). Desde el punto de vista estructural, las alcanidas representan una clase particular de productos naturales que se forman al combinarse dos diferentes rutas metabólicas. Están constituidas por un ácido graso, de longitud de cadena mediana o larga que puede variar desde ocho hasta dieciocho carbonos, generalmente alifática o lineal, unida a una amida procedente de algún aminoácido por descarboxilación al momento de su condensación. Las alcanidas son consideradas compuestos bioactivos, lo que significa que en bajas concentraciones estos compuestos activan una respuesta notable en las células receptoras. Estas sustancias están presentes en varias familias de plantas entre ellas: Aristolochiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Convolvaceae, Euphorbiaceae, Menispermaceae, Peperaceae, Poaceae, Rutaceae y Solanaceae (Molina-Torres y Ramírez-Chávez, 2001). Entre las plantas que contienen alcanidas en sus tejidos se encuentran *Echinacea purpurea*, *Echinacea angustifolia* y *Heliopsis longipes*, comúnmente los extractos de estas plantas son utilizados para el tratamiento del resfriado común e infecciones de las vías respiratorias y se ha estudiado la posibilidad de que este efecto ocurra por la interacción de las alcanidas con el sistema inmune, aunque esto todavía es cuestionable (Ramírez-Chávez *et al.*, 2004; Raduner *et al.*, 2006).

En las raíces de *Heliopsis longipes*, García-Chávez y col. (2004) encontraron un contenido total de alcanidas de 9.4 µg/g de peso seco de raíz

repartido en 8 compuestos, de los cuáles de acuerdo a la longitud del ácido graso prevalecían las decamidas (alcamidas de 10 átomos de carbono) seguidas por las undecamidas (11 átomos de carbono). La alcamida mayoritaria es la afinina, que se encuentra hasta en 1% de peso fresco y a ella se le atribuye los efectos específicos observados a estas raíces, entre los que se pueden considerar su acción como anestésico local, el estímulo organoléptico, así como su actividad insecticida y bactericida, por lo que se considera que las alcamidas deben constituir un elemento de defensa contra el ataque por patógenos y herbivoría en plantas que las contienen (García-Chávez *et al.*, 2004; Ramírez-Chávez *et al.*, 2004).

Una de las diferencias importantes del modo de acción de las alcamidas sobre la morfogénesis vegetal comparado con el de las auxinas, es que, mientras las auxinas inducen la formación de las raíces laterales a bajas concentraciones, las alcamidas tiene un efecto inductor en el crecimiento de la raíz primaria (10^{-5} – 10^{-4} M) y estimulan la formación de raíces laterales (Ramírez-Chávez *et al.*, 2004; Campos-Cuevas *et al.*, 2008). Se ha encontrado que la aplicación exógena de la alcamida amidenina estimula en un 20 y 50% la producción de biomasa de follaje y raíz, respectivamente, en plantas de arroz. Además, se mostró que en concentración de 60 μ M este compuesto presenta un efecto represor en el crecimiento de la raíz y el follaje (Kanbe *et al.*, 1993). Mediante estudios más recientes, se ha encontrado que la afinina altera el crecimiento y desarrollo del sistema radicular de *Arabidopsis*. En concentraciones de 7-14 μ M, este compuesto estimula el crecimiento de raíz primaria y la formación de raíces laterales, mientras que en concentraciones mayores de 28 y 56 μ M, se presenta un efecto inhibitorio (Fig. 4C), mientras que en pelos radiculares se estimula el crecimiento de estas estructuras (Ramírez-Chávez *et al.*, 2004).

Para esclarecer el mecanismo de señalización de las alcamidas sobre el desarrollo, recientemente, nuestro grupo de trabajo aisló y caracterizó una mutante resistente a la aplicación exógena de *N*-isobutil decanamida sobre la arquitectura radicular, nombrada *drr1* (*decanamide resistant root 1*) (Morquecho-Contreras *et al.*, 2010). El análisis de PRL reveló que *DRR1* es un elemento

requerido en la activación de células del periciclo para la formación de PRL en respuesta a *N*-isobutil decanamida (Morquecho-Contreras *et al.*, 2010).

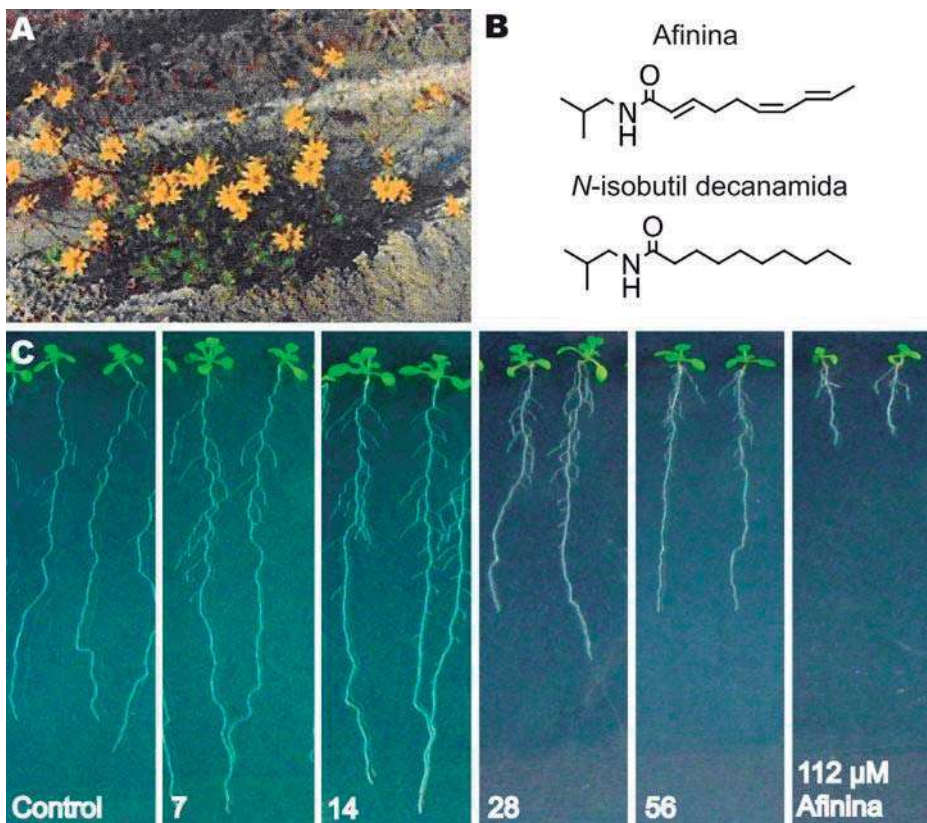


Figura 4. Las alcamidas y su efecto sobre el sistema radicular de *Arabidopsis thaliana*. (A) Planta cultivada de *Heliopsis longipes*. La raíz de esta planta es rica en la alcamida afinina. (B) Estructura química de dos alcamidas, afinina y *N*-isobutil decanamida. (C) Efecto morfológico de la afinina sobre la arquitectura radicular en plantas de *Arabidopsis thaliana* (Modificado de Ramírez-Chávez *et al.*, 2004; López-Bucio *et al.*, 2006).

2.8. Las auxinas.

La auxina natural más abundante es el ácido-3-indol acético (AIA). El AIA ha sido implicado en casi todos los aspectos del desarrollo y crecimiento de las plantas, así como en respuestas de defensa. Esta diversidad de funciones está ocasionada por la complejidad de la biosíntesis, transporte y vías de señalización del AIA. El AIA se sintetiza a partir del aminoácido triptófano, por al menos dos vías: la vía de la triptamina (TAM) y la del ácido-3-indol butírico (IPA) (Strader y Bartel, 2008). Una vez sintetizado, el AIA se distribuye a través de la planta vía un sistema de transporte célula-célula (Vieten *et al.*, 2007). El transporte de entrada y

salida de las auxinas conduce a la formación de gradientes o máximos de auxinas para regular procesos de crecimiento y desarrollo. La dirección y posición de los máximos de auxinas está determinada por la posición asimétrica de proteínas de transporte dentro de la célula.

Mediante estudios genómicos y celulares, se ha logrado caracterizar el mecanismo de señalización de las auxinas (Badescu y Napier, 2006). La transcripción regulada por las auxinas ocurre por la acción de dos grandes familias de factores transcripcionales que incluyen a las proteínas auxina/ácido-3-indol acético (Aux/IAA) y los FACTORES DE RESPUESTA A AUXINAS (ARFs). Los ARFs directamente se unen al ADN y pueden inhibir o activar la transcripción, dependiendo del tipo de ARF (Guilfoyle y Hagen, 2007). Las proteínas Aux/IAA se unen a los ARFs para reprimir la transcripción regulada por las auxinas (Szemenyei *et al.*, 2008).

Las proteínas Aux/IAA tienen una vida media corta y su degradación requiere de la vía de ubiquitinación y degradación por el proteosoma (Mockaitis y Estelle, 2008). Esta es una vía proteolítica conservada en la cual las proteínas designadas para la degradación son etiquetadas mediante una enzima que activa la ubiquitinación. Las proteínas etiquetadas son reconocidas por el proteosoma y degradadas. La vía de ubiquitinación fue implicada en las respuestas a auxinas con el aislamiento y caracterización de una mutante resistente a auxinas en *Arabidopsis* conocida como *transport inhibitor response 1 (tir1)* (Ruegger *et al.*, 1998). *TIR1* codifica una proteína F-box que interactúa directamente con las proteínas Aux/IAA. La afinidad de la unión se incrementa por las auxinas (Gray *et al.*, 2001). Estudios moleculares demostraron que las auxinas forman un complejo con las proteínas TIR1 y Aux/IAA para estabilizar la interacción (Tan *et al.*, 2007). El descubrimiento de que TIR1 funciona como un receptor de auxinas fue un hallazgo importante. Esto indica que las proteínas F-box pueden funcionar como receptores para moléculas pequeñas incluyendo el AIA.

En procesos sobre el desarrollo, las auxinas actúan como moléculas señal durante procesos de división, elongación y diferenciación celular, desde la embriogénesis al establecer la polaridad basal-apical y en la formación de los

meristemos de la raíz y el follaje, hasta el desarrollo post-embrionario (Bishopp *et al.*, 2006; Teale *et al.*, 2006). Estos procesos afectan el desarrollo de la raíz, incluyendo la formación y emergencia de raíces laterales, la organización del meristemo y la respuesta gravitrópica (Ljung *et al.*, 2001).

2.9. Óxido nítrico.

El óxido nítrico (ON) es un radical libre de vida media corta que en células animales modula procesos importantes como la neurotransmisión, las respuestas fisiológicas e inflamatorias y la relajación del músculo liso vascular (Schmidt, 1994). El ON se produce principalmente por la óxido nítrico sintasa (NOS), la cual cataliza la oxidación dependiente de NADPH de L-arginina a L-citrulina y ON (Stuehr *et al.*, 2004). La identificación de las enzimas que catalizan la síntesis de ON, así como el descubrimiento que el ON controla la actividad de proteínas específicas a través de procesos químicos dentro de compartimentos sub-celulares, ha motivado investigaciones tendientes a elucidar su función en las plantas (Hanafy *et al.*, 2001; Kone *et al.*, 2003; Stuehr *et al.*, 2004).

En los vegetales se han documentado dos vías enzimáticas distintas que participan en la generación de ON: una vía dependiente de nitrito/nitrato y otra dependiente de L-Arg. La primera vía involucra la nitrato reductasa (NR) citosólica (Yamasaki y Sakihama, 2000) y la reductasa de nitrito a ON (Ni-NOR) de la membrana plasmática, específica de células de la raíz (Stohr *et al.*, 2001). *A. thaliana* tiene dos genes que codifican NR, *NIA1* y *NIA2*, ambos con un alto porcentaje de identidad (83.5%). Estudios *in vivo* indican que la NR puede ser responsable de la producción basal de ON en las hojas y las raíces de varias especies (Rockel *et al.*, 2002; Vanin *et al.*, 2004); este proceso es controlado por el estado de fosforilación de la enzima (Lea *et al.*, 2004). La primera evidencia descrita del papel de la NR como una fuente de ON en procesos de transducción de señales surgió mediante el análisis de la doble mutante de *Arabidopsis* deficiente en NR, *nia1 nia2*, la cual es resistente a los efectos del ácido abscísico (ABA) sobre el cierre de estomas, lo que indica que la síntesis de ON mediada por la NR es un paso importante en la señalización de ABA en células guardianas

(Bright *et al.*, 2006; Desikan *et al.*, 2004). Además de la NR, la Ni-NOR está involucrada en la biosíntesis de ON a partir de nitrito, pero exclusivamente en raíces. La actividad de la Ni-NOR está coordinada con la NR, la cual posteriormente reduce nitrato a nitrito y a su vez produce ON (Stohr *et al.*, 2001). La Ni-NOR puede estar involucrada en varios procesos fisiológicos de la raíz, incluyendo el desarrollo, la respuesta a anoxia y los eventos de simbiosis con microorganismos (Stohr y Stremmler, 2006). La identidad molecular de la Ni-NOR se desconoce. También se han reportado otros mecanismos dependientes de nitrito para la síntesis de ON, estos incluyen la reducción química de nitrito a ON en pH ácido en el apoplasto y una producción mitocondrial en la cual la reducción a ON está dirigida por la cadena de transporte de electrones (Planchet *et al.*, 2005)

Aunque no se ha encontrado ningún homólogo de la NOS animal en el genoma de Arabidopsis, la vía dependiente de L-Arg puede involucrar una enzima parecida a la NOS. Apoyando esto, se han detectado actividades similares a la NOS en varios tejidos de plantas y en orgánulos purificados, incluyendo la mitocondria, el núcleo y los peroxisomas (Barroso *et al.*, 1999; Corpas *et al.*, 2006; Cueto *et al.*, 1996). Una búsqueda para la enzima que cataliza esas actividades en Arabidopsis llevó a la clonación del gen *AtNOS1*, el cual codifica una enzima mitocondrial que muestra secuencias similares con una proteína involucrada en la síntesis de ON en el caracol *Helix pomatia* (Guo y Crawford, 2005; Guo *et al.*, 2003).

La contraparte de esto es que la AtNOS1 no está estructuralmente relacionada con la NOS animal clásica. Estudios genéticos para elucidar las funciones de AtNOS1 han revelado que esta enzima juega un papel clave en la transición floral (He *et al.*, 2004), y es la fuente principal de ON en la señalización modulada por ABA (Guo *et al.*, 2003) y lipopolisacáridos (LPS) (Zeidler *et al.*, 2004). Aunque la mutante *Atnos1* claramente posee un bajo nivel de ON en diversas condiciones de crecimiento, la capacidad de la AtNOS1 recombinante para mostrar actividad de NOS fue cuestionada recientemente (Crawford *et al.*, 2006; Zemojtel *et al.*, 2006), por lo que AtNOS1 fue renombrada a AtNOA1 (NO-

associated protein 1). Un estudio sobre el alineamiento de secuencias y el análisis estructural, indica que AtNOA1 puede funcionar como una GTPasa involucrada en la biogénesis ribosomal, de las mitocondrias y/o procesos de traducción (Moreau *et al.*, 2008). Debido a que la mitocondria es una fuente importante de ON (Guo y Crawford, 2005; Guo *et al.*, 2003), esto puede explicar porqué la síntesis de ON está reducida en la mutante *Atnoa1*. Sin embargo, la mutante de *Atnoa1* es útil por su fenotipo, el cual muestra niveles reducidos de ON durante el crecimiento de la planta, fertilidad, señalización hormonal, tolerancia a salinidad y respuestas al ataque por patógenos (Guo *et al.*, 2003; Zeidler *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2007).

El ON participa en procesos del crecimiento y desarrollo de la raíz. Por ejemplo, se ha observado que tratamientos con auxinas inducen un incremento en la concentración de ON que promueve la formación de raíces adventicias (AR) en explantes de calabaza (Pagnussat *et al.*, 2002). Posteriormente, se demostró que la aplicación de auxinas a raíces resulta en la producción localizada de ON durante la formación de raíces laterales (LR) y pelos radiculares (RH), así como también la acumulación de ON en la punta de la raíz durante respuestas gravitrópicas (Correa-Aragunde *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2005). La formación de LR, AR, y RH inducida por auxinas, así como las respuestas gravitrópicas fueron inhibidas por la aplicación exógena del agente oxidante específico de ON, el cPTIO, lo que sugiere una función clave del ON endógeno en regular estos procesos morfológicos. Sin embargo, la aplicación de ON fue capaz de revertir el efecto bloqueador del inhibidor del transporte de auxinas ácido 1- naftilftalamico (NPA; Pagnussat *et al.*, 2003; Correa-Aragunde *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2005). Estos resultados sugieren que el ON es una molécula importante que opera cascada abajo en la señalización por auxinas durante el crecimiento y desarrollo de la raíz. Además de las auxinas, se ha encontrado que la alcalamida *N*-isobutil decanamida incrementa los niveles de ON en las zonas de formación de raíces adventicias (Campos-Cuevas *et al.*, 2008), sugiriendo la participación del ON para regular estos procesos fisiológicos en respuesta a las alcalamidas.

Uno de los primeros análisis vinculando al ON y los movimientos estomáticos, se realizó por Garcia-Mata y Lamatina (2002), quienes observaron

que el ON induce el cierre de los estomas, reduce la tasa de transpiración y eleva las respuestas adaptativas de la planta al estrés por sequía. El cierre de los estomas inducido por ON ocurre de manera dependiente de Ca^{2+} en plantas mono y dicotiledóneas. A partir de esto, una gran cantidad de reportes han confirmado la participación del ON en el funcionamiento de las células guardianas (Neill *et al.*, 2002; Desikan *et al.*, 2002; Garcia-Mata *et al.*, 2003). Como resultado, ahora se sabe que en las células guardianas, el ON endógeno se produce por la nitrato reductasa (NR) y su acumulación depende de la especie vegetal y las condiciones fisiológicas (Desikan *et al.*, 2002).

Gran parte de estos resultados se han obtenido mediante la aplicación de donadores para emular la producción de ON, tales como el nitroprusiato de sodio (SNP), agentes oxidantes específicos de ON como 2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-oxido (PTIO) o 2-(4-carboxyfenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-oxido (cPTIO) para bloquear la señal (Goldstein *et al.*, 2003). Los niveles endógenos de ON en los diferentes tejidos vegetales se han estudiado con el uso de compuestos fluorescentes como el 4,5-diacetato de fluoresceína (DAF-2 DA), el cual emite una fluorescencia cuando se une al N_2O_3 formado por la reacción de ON con NO_2 (Wilson *et al.*, 2008).

Mediante el uso de estas diferentes estrategias, se ha logrado elucidar la señalización del ON en varios procesos asociados al desarrollo en plantas, como es la diferenciación del xilema, la muerte celular programada, el desarrollo de raíces laterales y adventicias, la floración, el cierre estomático, el gravitropismo, la expansión celular, la fotomorfogénesis y la senescencia (Desikan *et al.*, 2002; Grün *et al.*, 2006; Correa-Aragunde *et al.*, 2004; Beligni y Lamattina, 2001; Neill *et al.*, 2003) (Fig. 5).

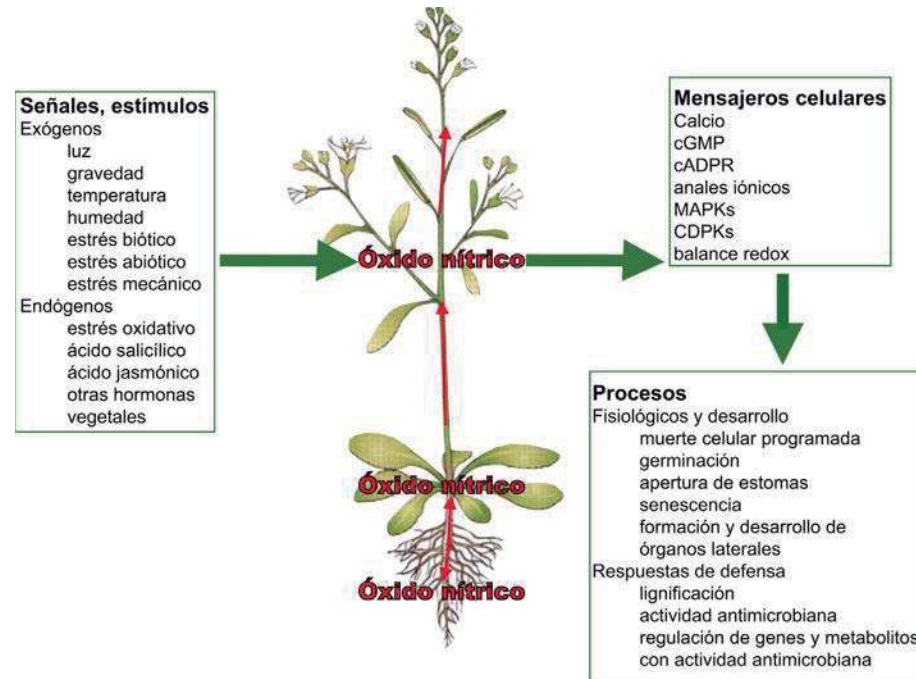


Figura 5. El óxido nítrico regula procesos relacionados con el desarrollo, crecimiento y respuestas adaptativas de las plantas (Modificado de Lamattina, 2005).

3. JUSTIFICACIÓN.

Los estudios antes descritos, han puesto de manifiesto que las alcanidas, un grupo novedoso de moléculas con diversas funciones sobre el desarrollo vegetal, afectan procesos regulados por el óxido nítrico. En particular, la formación de raíces adventicias a partir de explantes de *Arabidopsis thaliana* bajo tratamientos con la *N*-isobutil decanamida depende de la acumulación localizada de óxido nítrico en los sitios de proliferación de estas estructuras (Campos-Cuevas *et al.*, 2008). Estos hallazgos, reportados previamente por nuestro grupo, permiten inferir que las alcanidas modulan diversos programas morfogénicos en las plantas, incluyendo el crecimiento de la raíz primaria, la formación de raíces laterales y pelos radiculares induciendo la acumulación diferencial de ON en los diferentes tejidos. Por lo tanto, es importante esclarecer las posibles interacciones genéticas que participan en la respuesta de *Arabidopsis* a la *N*-isobutil decanamida y al óxido nítrico utilizando mutantes de *Arabidopsis* afectadas en los genes que codifican para proteínas implicadas en la síntesis de ON (*nia1 nia2*, *Atnoa1*) y una mutante afectada en la percepción de alcanidas (*drr1*).

4. HIPÓTESIS.

Los efectos de la *N*-isobutil decanamida sobre la arquitectura de la raíz involucran la participación del óxido nítrico en *Arabidopsis thaliana*.

5. OBJETIVOS.

5.1. Objetivo general.

Evaluar la participación del óxido nítrico en la regulación del desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana* y en las respuestas a la *N*-isobutil decanamida.

5.2. Objetivos específicos.

- Evaluar la participación del óxido nítrico en procesos de división, elongación y diferenciación celular.
- Estudiar los efectos del óxido nítrico en el desarrollo de la raíz en plantas silvestres y en las mutantes *drr1* de *Arabidopsis thaliana* resistentes a *N*-isobutil decanamida.
- Evaluar los niveles endógenos de óxido nítrico en plantas silvestres y en las mutantes *drr1*.
- Caracterizar las respuestas de plantas silvestres de *Arabidopsis* y las mutantes *Atnoa1* y *nia1 nia2* que presentan niveles disminuidos de óxido nítrico a la *N*-isobutil decanamida.
- Analizar los niveles de expresión de genes de respuesta a auxinas en respuesta a óxido nítrico y *N*-isobutil decanamida.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1. Material biológico.

Para llevar a cabo los diferentes diseños experimentales se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* de los ecotipos Columbia (Col-0) y Wassilewskija (Ws), así como diferentes mutantes con niveles disminuidos de ON, *Atnoa1*, *nia1 nia2* y mutantes resistentes a *N*-isobutil decanamida, *drrr1*.

6.2. Compuestos químicos.

La *N*-isobutil decanamida se obtuvo por reducción catalítica de la afinina, la alcalamida más abundante en las raíces de *Heliopsis longipes*, como fue descrito anteriormente (Ramirez-Chavez *et al.*, 2004). La pureza de este compuesto es mayor al 99%, según se verificó por cromatografía de gases-masas (GC-MS) (Molina-Torres *et al.*, 1996). Los donadores de óxido nítrico SNP y SNAP y el agente oxidante de ON, cPTIO fueron adquiridos de la casa Sigma. La *N*-isobutil decanamida fue disuelta en etanol, mientras que el resto de los compuestos en dimetil sulfóxido (DMSO). En plántulas control se adicionó el solvente respectivo en un volumen equivalente a la concentración más alta del compuesto en el bioensayo.

6.3. Preparación de las semillas.

Para realizar los bioensayos en condiciones axénicas, primeramente las semillas de las diferentes líneas se sometieron a una desinfección superficial, colocándolas en un tubo Eppendorf; después, se agregaron 500 µl de etanol al 96% v/v y se sometieron a una agitación durante 5 min. Transcurrido el tiempo, se les retiró el etanol y se les adicionaron 700 µl de hipoclorito de sodio al 20% v/v, agitando por 7 min. Finalmente, se retiró el hipoclorito de sodio y se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril. Todo este proceso fue llevado a cabo en una campana de flujo laminar. Finalmente, las semillas fueron colocadas en oscuridad

a 2 °C durante 48 horas, con el objetivo de estimular y homogenizar la germinación.

6.4. Condiciones de crecimiento.

Las semillas desinfectadas fueron sembradas y cultivadas bajo condiciones de esterilidad en cajas de Petri conteniendo 30 ml de medio de Murashige y Skoog (MS) 0.2x, el cual contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas, suplementado con 0.6% de sacarosa y 1% de agar. El pH del medio se ajustó a 7.0 con KOH 0.1 N. Una vez preparado el medio, éste se somete a esterilización en el autoclave (120 °C y 15 lb de presión durante 20 min.). El medio MS contiene 2.0 mM NH_4NO_3 , 1.9 mM KNO_3 , 0.3mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.15 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 5 μM H_3BO_3 , 0.1mM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.3 mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 μM $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 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 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 mM $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, (inositol (10 mg.L⁻¹) y Glicina (0.2mg.L⁻¹).

6.5. Análisis de crecimiento.

El sistema radicular de Arabidopsis y la integridad del meristemo de la raíz, fueron analizados con un microscopio estereoscópico (Leica, MZ6). Las raíces laterales emergidas de la raíz primaria se observaron con el objetivo de 3x y se cuantificaron para los valores de raíces laterales que fueron graficados. Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital SAMSUNG SCC 131-A adaptada al microscopio. La longitud de la raíz primaria se determinó para cada una de las raíces, utilizando una regla. El número de raíces laterales se determinó contando las raíces laterales por plántula y la densidad de raíces laterales dividiendo el número de raíces laterales entre la longitud de la raíz primaria, para cada una de las plántulas. Para los ensayos de transferencia, las raíces laterales fueron cuantificadas de la punta de la raíz a la zona de inicio de la transferencia, para determinar la formación de primordios de raíces laterales (PRL) en el mismo ensayo, las plántulas fueron clareadas y montadas en portaobjetos y analizadas con un microscopio (Leica CME) en los aumentos 20x y 40x. Para determinar el crecimiento y el número de pelos radiculares, se midió la longitud de 10 pelos

radiculares de la zona de máximo crecimiento en la raíz primaria por plántula (n=10 plántulas), mientras que el número de pelos radiculares se cuantificó contando el número de estas estructuras por mm de longitud de la raíz primaria (n=10 plántulas). Este análisis se llevó a cabo utilizando el software Image J.

Para todos los experimentos con las líneas silvestres y mutantes, los datos fueron analizados estadísticamente usando el programa Statistic 6.0. Se graficaron las medias de cada tratamiento con su respectivo error estándar y para analizar la validez de los resultados encontrados, se realizó un análisis de una sola variante o multi-variantes seguida por una prueba post-hoc de Tukey. Se utilizaron letras diferentes para indicar las medias con diferencia significativa ($P < 0.05$).

6.6. Determinación de los estados de desarrollo de los primordios de raíces laterales.

Los primordios de raíces laterales (PRL) se cuantificaron en plántulas de 7 días de edad. Primeramente, las plántulas fueron clareadas para poder visualizar y cuantificar los PRL en estados temprano del desarrollo. Cada PRL se ordenó acorde al estado del desarrollo según lo reportan Malamy y Benfey (1997). Los estados del desarrollo se explican a continuación: Estado I, iniciación del PRL: en el plano longitudinal, aproximadamente de 8-10 células pequeñas se forman del periciclo. Estado II, el PRL formado se divide de manera periclinal formando dos capas celulares. Estado III, la capa externa del PRL se divide periclinalmente, generando un primordio de tres capas celulares. Estado IV, el primordio se divide de forma periclinal y anticlinal, formando un PRL con cuatro capas celulares. Estado V, el PRL se encuentra a la altura del cortex. Estado VI, el PRL ha atravesado las células del córtex y se encuentra penetrando la epidermis. Estado VII, el PRL se encuentra e punto de emerger como raíz lateral.

6.7. Microscopia confocal.

Detección de óxido nítrico. Los niveles endógenos de óxido nítrico fueron monitoreados incubando plántulas de *Arabidopsis* con 10 μ M del fluorocromo DAF-2DA (Kojima *et al.*, 1998) en Tris-HCl 0.1 M (pH=7.4). Las plántulas crecidas en condiciones control y en presencia de los diferentes compuestos se incubaron durante 2 horas en obscuridad, transcurrido este tiempo se lavaron tres veces con amortiguador fresco, dejando 20 min entre cada lavado. Las señales fluorescentes se detectan usando un microscopio confocal de escaneo laser (Olympus; modelo BX50) y monitoreadas con un laser de argón con un rango de excitación de 488-568 nm y 585-610 de emisión. Las señales fluorescentes se cuantificaron analizando el número de pixeles en el canal verde utilizando el software Image J.

Detección de la proteína amarillo fluorescente (YFP) y tinción con yoduro de propidio (IP). Para la detección de la proteína YFP se utilizaron líneas transgénicas de *Arabidopsis*, *AtH₂B:YFP*. Para la tinción fluorescente con IP, se colectaron plántulas de la línea *AtH₂B:YFP* crecidas en condiciones control y en presencia de SNP y fueron transferidas a una solución de IP 10 mg ml⁻¹ por 3 min. Las plántulas fueron lavadas en agua y fijadas en glicerol al 50% sobre portaobjetos. La misma muestra fue registrada de manera separada en longitudes de onda específicas para la fluorescencia de IP a 568 nm de excitación y 585-610 nm de emisión, mientras que para YFP fue con 485 nm de excitación y 505-550 nm de emisión, después las dos imágenes se traslapan para formar la imagen final.

6.8. Análisis histoquímico.

Para el análisis histoquímico de la actividad de GUS, plántulas transgénicas de *Arabidopsis* *EXP7:uidA*, *DR5:uidA* y *BA3:uidA* se sumergieron en amortiguador de reacción de GUS (0.5 mg ml⁻¹ de 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-gluconido en fosfato de sodio 100 mM, pH=7) y se incubaron por 14 horas a 37 °C. Las plántulas así teñidas fueron clareadas mediante el método de Malamy y Benfey (1997). Para cada tratamiento, al menos 10 plántulas fueron analizadas. Una plántula representativa fue elegida para cada tratamiento y fotografiada utilizando el microscopio Leica CME.

7. RESULTADOS.

7.1. Participación del óxido nítrico en procesos de diferenciación.

El óxido nítrico (ON) es una biomolécula altamente reactiva que está involucrada en una gran cantidad de procesos del desarrollo. Sin embargo, durante el crecimiento de las plantas, se desconoce el grado de participación del ON en los procesos de división, elongación y diferenciación celular. Para estudiar posibles funciones del ON sobre estos procesos, se utilizó el fluorocromo DAF-2DA, el cual es capaz de difundirse libremente a través de la membrana celular y posteriormente se une de manera específica al ON, formando un compuesto fluorescente, donde la intensidad de la fluorescencia será directamente proporcional a los niveles de ON. La fluorescencia emitida por el fluorocromo DAF-2DA reveló la presencia del ON en las diferentes regiones de la raíz de *Arabidopsis* (Fig. 6A). Para determinar con mayor precisión el papel del ON sobre los procesos celulares, se analizó a detalle la presencia y niveles de ON en cada una de las regiones de la raíz, siendo evidente un incremento de la fluorescencia en la punta de la raíz, particularmente en células de la cofia (Fig. 6B), las cuales son en su mayoría células diferenciadas. Interesantemente, la fluorescencia también fue encontrada en la zona de diferenciación celular de la raíz primaria, región donde ocurre la formación de pelos radiculares (Fig. 6C). Los tricoblastos (células epidérmicas destinadas a la formación de pelos radiculares) y los propios pelos radiculares mostraron un incremento de ON, evidenciado por una intensa fluorescencia localizada (Fig. 6D).

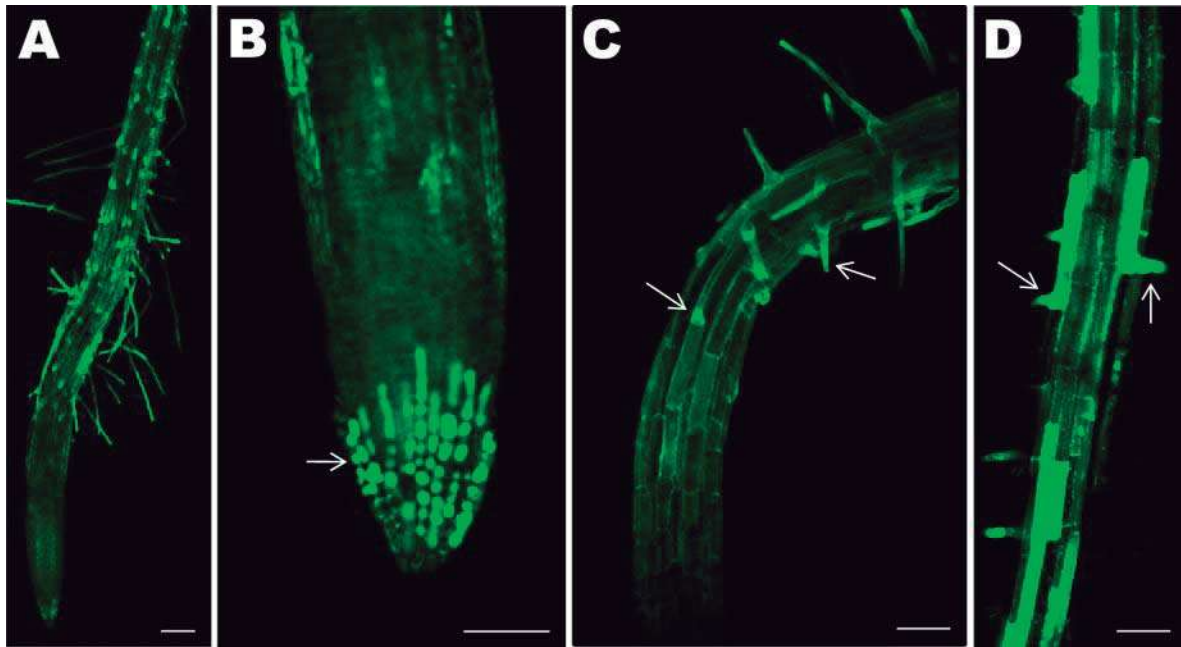


Figura 6. Acumulación del ON en la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Plantas silvestres (Col-0) de 7 días de edad fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2x. Se realizó un análisis de los niveles endógenos de ON por microscopía confocal en la raíz primaria (A), células de la cofia de la raíz primaria (B), región de diferenciación de la raíz (C) y en tricoblastos (D). Fotografías representativas de un total de 10 plantas analizadas.

7.2. Los donadores de ON, SNP y SNAP activan procesos de iniciación y crecimiento de pelos radiculares en *Arabidopsis*.

Una estrategia ampliamente utilizada para investigar la señalización del ON en el desarrollo de las plantas involucra la aplicación farmacológica de donadores de ON, tales como el SNP y el SNAP, para inducir la acumulación de ON. Para determinar si los donadores de ON podrían alterar el desarrollo de los pelos radiculares, plántulas silvestres de *Arabidopsis* (Col-0) fueron germinadas y crecidas con diferentes concentraciones de SNP o SNAP. El SNP aumenta de forma significativa la longitud de los pelos radiculares de manera dependiente de la concentración, presentando un efecto inductor de hasta dos veces en plantas crecidas en 40 μ M SNP, también estimula la formación de pelos radiculares *de novo*, siendo más evidente en plántulas tratadas con 40 μ M SNP, comparado con el control (Fig. 7A, B). Por otro lado, el SNAP mostró una menor actividad que el SNP ya que en concentración de 80 μ M induce el crecimiento de los pelos

radiculares comparado con el tratamiento control, además estimula la formación *de novo* de estas estructuras (Fig. 7C,D).

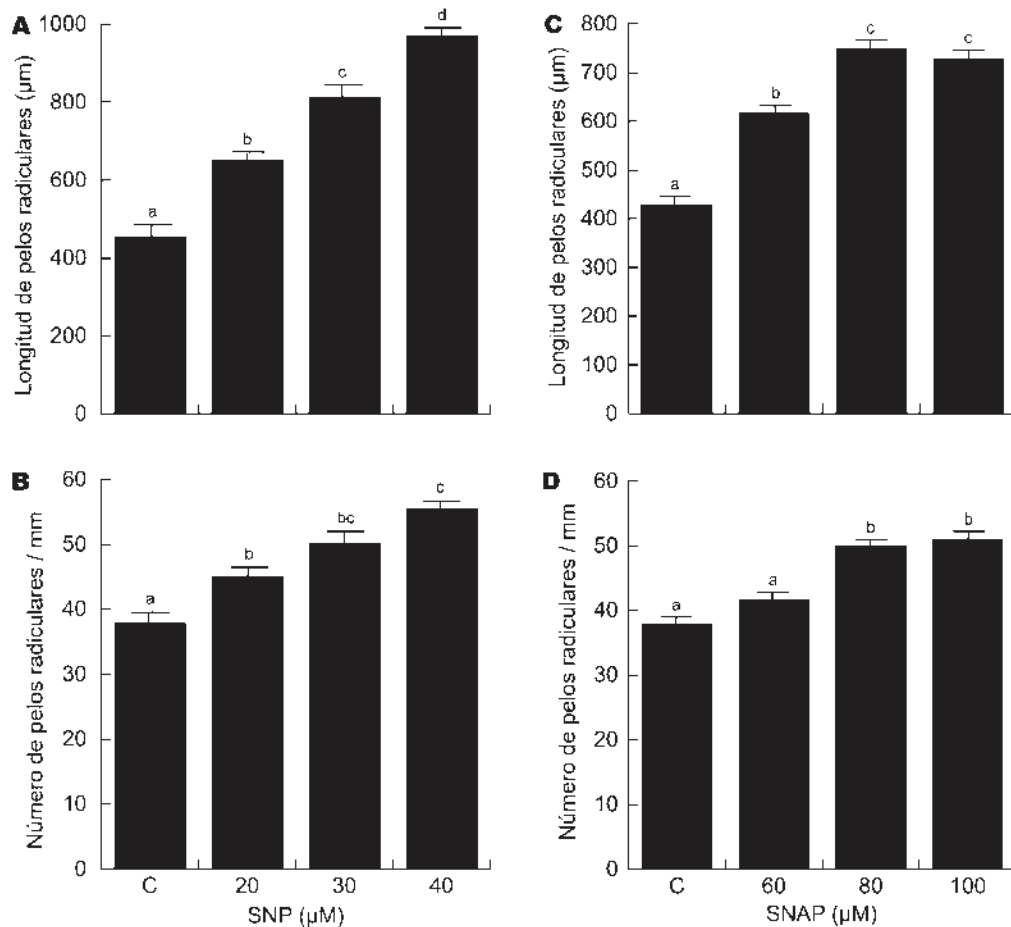


Figura 7. Efecto de donadores de ON, SNP y SNAP sobre procesos de diferenciación. (A y C) Longitud de pelos radiculares, (B y D) Número de pelos radiculares en plantas de *Arabidopsis thaliana* de 4 días de edad. Análisis por microscopía óptica, se cuantificaron 10 pelos radiculares por planta (n=10 plantas). Letras diferentes indican medias que presentan diferencia significativa (P<0.05). Las barras representan la desviación estándar.

7.3. El efecto inductor del SNP sobre pelos radiculares correlaciona con un incremento de los niveles de ON.

Para determinar si el efecto inductor del SNP sobre el crecimiento y la formación de los pelos radiculares es causado por un incremento en la concentración de ON en la raíz, se analizaron los niveles endógenos de ON por microscopia confocal en la raíz de plantas germinadas y crecidas en presencia o

ausencia de SNP. Se encontró que efectivamente, las plantas que fueron expuestas a 30 μ M de SNP presentaron mayores niveles de ON, revelado por el incremento de la intensidad de fluorescencia, la cual fue evidente prácticamente en todas las zonas de la raíz y que además este aumento en la fluorescencia es correspondiente al efecto inductor del SNP sobre los pelos radiculares (Fig. 8A). Esto nos indica que el efecto del SNP sobre procesos de diferenciación correlaciona con un incremento de los niveles endógenos de ON. Estos resultados sugieren que el ON actúa como un regulador endógeno importante en procesos de diferenciación celular.

7.4. El SNP y SNAP inducen la expresión del marcador de diferenciación celular *AtEXP7:uidA*.

Además de evaluar a nivel morfológico el efecto de los donadores de ON, también se analizó a nivel molecular la respuesta de estos donadores sobre los patrones de expresión del marcador de diferenciación celular *AtEXP7:uidA*, cuya expresión está relacionada con los programas de iniciación y crecimiento de los pelos radiculares (Cho y Cosgrove, 2002). Mediante un ensayo de inducción en medio líquido, se evaluó el efecto de los donadores SNP y SNAP sobre los niveles de expresión de *AtEXP7:uidA*, utilizando AIA como control positivo. Se logra apreciar como ambos donadores inducen la expresión del marcador de manera similar al ácido indol-3-acético, una auxina natural que regula positivamente el desarrollo de los pelos radiculares (Fig. 8B). El aumento en los niveles de expresión del marcador en respuesta a los donadores correlaciona con el efecto inductor del crecimiento y formación *de novo* de pelos radiculares. Este análisis nos muestra que el ON es capaz de activar la diferenciación de los tricoblastos y que al menos en parte, mediante la regulación de la expresión de genes asociados a la diferenciación celular.

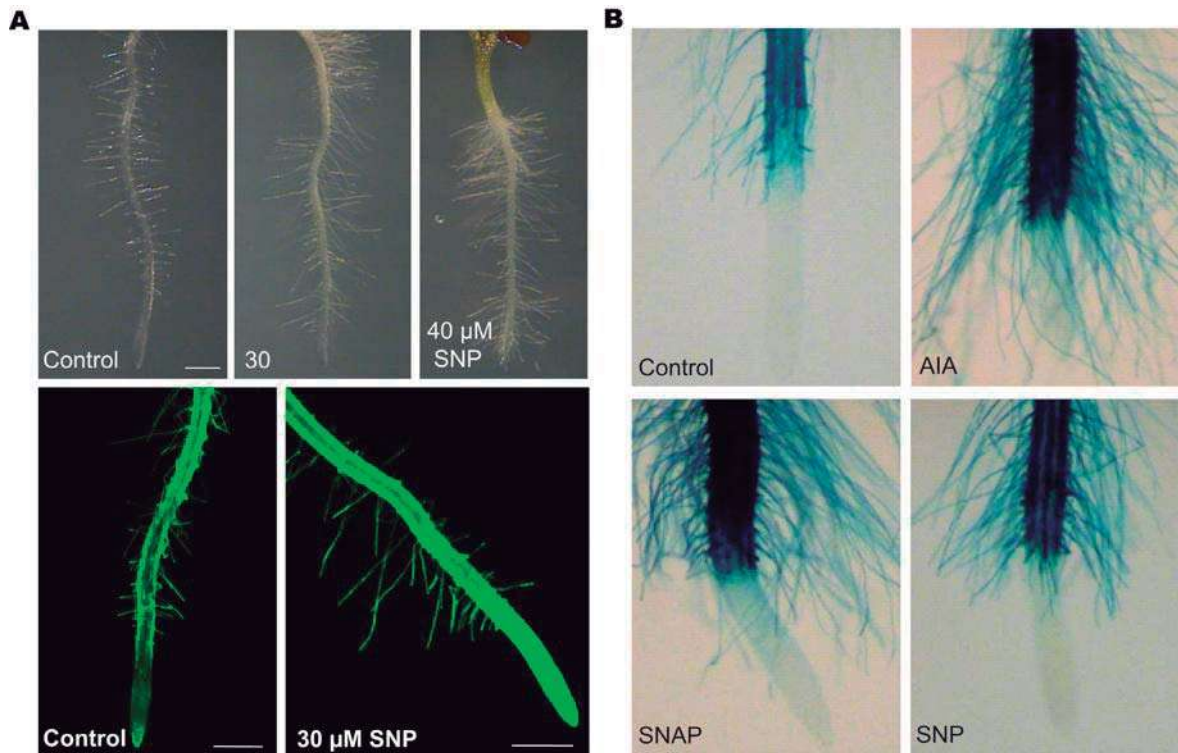


Figura 8. El SNP y SNAP incrementan los niveles endógenos de ON y aumentan la expresión de genes asociados a diferenciación celular. (A) Efecto visual del donador SNP sobre el desarrollo de los pelos radiculares y detección de los niveles endógenos de ON por microscopía confocal. (B) Expresión del marcador de diferenciación celular *AtEXP7:uidA* en respuesta a 5 μM AIA, 100 μM SNAP y 40 μM SNP. Las fotografías son representativas de al menos 10 plantas analizadas. Barra de aumento = 500 μm.

7.5. El donador de ON SNP estimula procesos de diferenciación celular en mutantes deficientes en la biosíntesis de ON, *Atnoa1* y *nia1 nia2*.

Se han reportado mutantes de *Arabidopsis* deficientes en la producción de ON que incluyen a *Atnoa1* y *nia1 nia2*, las cuales muestran fenotipos alterados sobre el desarrollo de la raíz. Para explorar a nivel genético la contribución de los genes *AtNOA1*, *NIA1* y *NIA2* en respuesta al SNP sobre los patrones de diferenciación celular, analizamos el efecto de este donador en plántulas silvestres (Col-0), en la mutante sencilla *Atnoa1* y en la doble mutante *nia1 nia2*. Cuatro días posteriores a la germinación se cuantificó el número y el tamaño de los pelos

radiculares de plantas de cada una de las líneas. En condiciones control, la raíz primaria de las mutantes *Atnoa1* y *nia1 nia2* mostraron menor cantidad de pelos radiculares por unidad de longitud y de menor tamaño, si lo comparamos con plántulas silvestres (Col-0) (Fig. 9A-C), indicando genéticamente como una disminución en la producción de ON afecta procesos de diferenciación celular. Sin embargo, cuando estas líneas mutantes se crecen en presencia del SNP se observa claramente un efecto inductor sobre el crecimiento y el número de pelos radiculares, mostrando un comportamiento muy similar al de plántulas Col-0 (Fig. 9A-C). Estos resultados indican que los mecanismos de percepción del ON en la célula no se encuentran alterados en las mutantes afectadas en la biosíntesis de ON, ya que responden de manera similar que las plántulas silvestres.

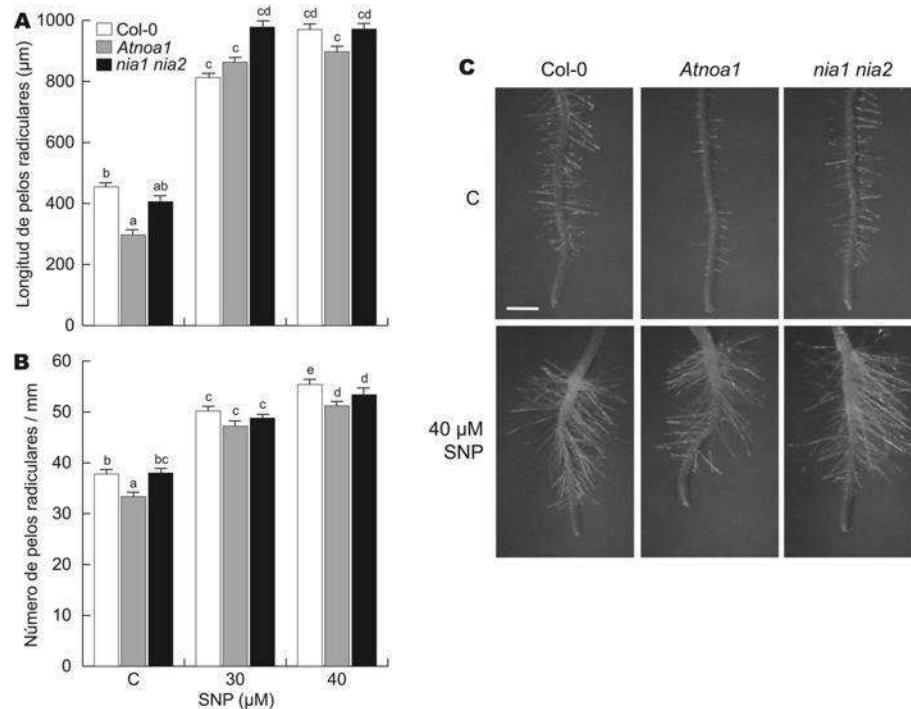


Figura 9. Efecto del SNP sobre procesos de diferenciación en mutantes de Arabidopsis afectadas en la biosíntesis de ON. Plántulas silvestres (Col-0) y mutantes *Atnoa1* y *nia1 nia2* fueron germinadas y crecidas en medio con el solvente (control), 30 y 40 µM SNP. Cuatro días después de la germinación se determinó la longitud de los pelos radiculares (A) y el número de pelos radiculares por mm (B), analizando 10 pelos radiculares por planta (n=10 plantas). (C) Efectos visuales del SNP en la formación de pelos radiculares. Las fotografías son representativas de al menos 10 plantas analizadas. Letras diferentes denotan medias que son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$). Barra de aumento = 500 µm; las barras representan la desviación estándar.

7.6. La *N*-isobutil decanamida induce cambios morfológicos en la raíz de *Arabidopsis*, acompañados por un incremento de los niveles de ON.

Al igual que los donadores de ON, las alcanidas regulan la arquitectura radicular de *Arabidopsis*, por lo que fue interesante determinar si el ON estaba participando en estos cambios morfogenéticos en respuesta a la alcanida *N*-isobutil decanamida. Previamente, nuestro grupo reportó que las alcanidas incrementan los niveles de ON durante la formación de raíces adventicias en explantes de *Arabidopsis* (Campos-Cuevas *et al.*, 2008), sin embargo, se desconocía si el ON está involucrado en la regulación de la arquitectura radicular en respuesta a las alcanidas, por lo que determinamos los niveles de ON en la raíz de plántulas de *Arabidopsis* germinadas y crecidas en medio MS 0.2x y en concentraciones crecientes de *N*-isobutil decanamida. Como se reportó previamente (López-Bucio *et al.*, 2007), esta alcanida inhibe el crecimiento de la raíz primaria e incrementa el número y la densidad (número de raíces laterales / cm) de raíces laterales, de manera dependiente de la concentración (Fig. 10 A-C). Para detectar el ON, las plántulas crecidas en condiciones control y en presencia de *N*-isobutil decanamida fueron teñidas con el fluorocromo DAF-2DA y posteriormente analizadas por microscopia confocal. Interesantemente, los niveles de ON se incrementan de manera dependiente de la concentración de *N*-isobutil decanamida, evidenciados por la fluorescencia del DAF-2T, esta respuesta correlaciona con la reducción del crecimiento de la raíz primaria y el aumento en la formación de raíces laterales en respuesta a la alcanida (Fig. 10D-H). Además de la fuerte inhibición del crecimiento de la raíz primaria observado en plántulas tratadas con 25 y 50 μ M de *N*-isobutil decanamida, se observó la formación de pelos radiculares cerca de la punta de la raíz (Fig. 10G, H). El incremento de la fluorescencia en la punta de la raíz primaria en respuesta a tratamientos con la alcanida, sugiere que posiblemente el ON esta modulando la respuesta de la *N*-isobutil decanamida sobre los cambios morfológicos de la raíz.

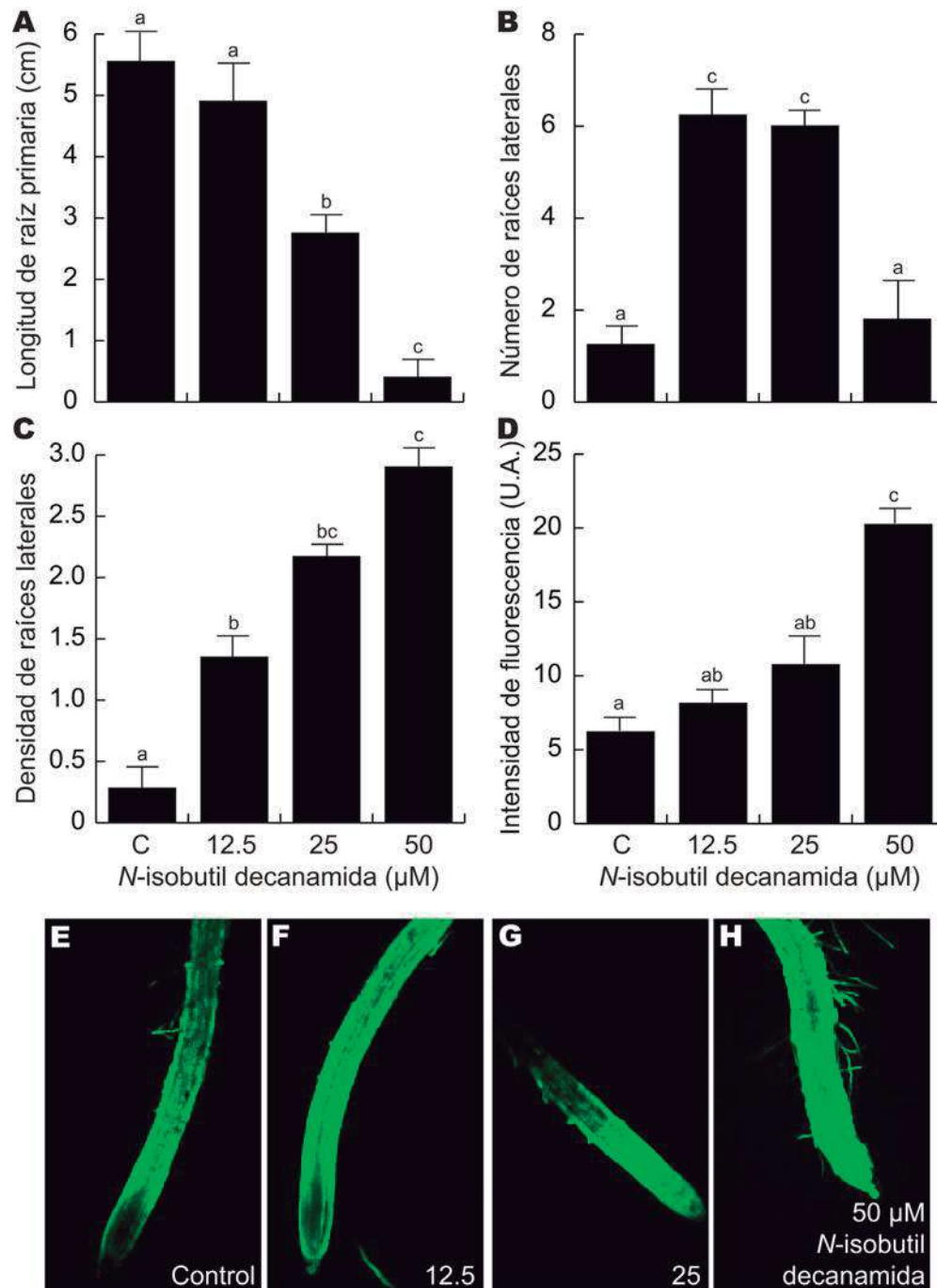


Figura 10. Efectos de la *N*-isobutil decanamida en la arquitectura radicular y sobre la acumulación de ON. (A) Longitud de raíz primaria, (B) Número de raíces laterales y (C) Densidad de raíces laterales (número de raíces laterales por cm) de plantas silvestres (Col-0) de 7 días de edad. (D) Cuantificación de la fluorescencia del DAF-2T emitida por las raíces (n=10). La gráfica esta expresada en unidades arbitrarias. (E-H) Detección de ON endógeno con DAF-2DA en la raíz primaria de plantas de 7 días de edad. Los valores mostrados en A, B y C representan la media de 30 plantas \pm error estándar. Letras diferentes denotan las medias que son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$). Las fotografías son representativas de al menos 10 plantas analizadas.

7.7. Los donadores de ON mimetizan los efectos de la *N*-isobutil decanamida en la arquitectura radicular de *Arabidopsis*.

Para determinar si el ON regula el sistema radicular de *Arabidopsis* de manera similar a la *N*-isobutil decanamida, se evaluó el efecto de la aplicación exógena de dos donadores de ON, el SNP y el SNAP en plántulas silvestres de *Arabidopsis* (Col-0) germinadas y crecidas en presencia de concentraciones crecientes de ambos donadores. Se observó una inhibición del crecimiento de la raíz primaria de manera dosis dependiente en plántulas tratadas con SNP, cuando se comparan con plántulas tratadas con el solvente (Fig. 11A). El análisis de la densidad de raíces laterales reveló que las plántulas tratadas con 40 y 50 μM SNP forman entre 3 y 5 veces más raíces laterales que las plantas tratadas con el solvente, respectivamente (Fig. 11B). La arquitectura radicular de las plántulas tratadas con SNP, se ve modificada en función de la concentración, de ser una raíz primaria larga con bajo número de raíces laterales a una raíz primaria corta altamente ramificada (Fig. 11C). El SNP es un donador de ON potencialmente tóxico, ya que al disolverse libera otros compuestos, como el HCN. Por lo tanto, se investigó si un segundo donador de ON, el SNAP, podría alterar el sistema radicular de *Arabidopsis*. De manera similar a lo observado con el SNP, la aplicación de SNAP al medio de cultivo modula el crecimiento de la raíz primaria y la formación de raíces laterales, aunque en concentraciones mayores que el SNP (Fig. 11D-F). Estos resultados indican que los efectos morfológicos inducidos por los donadores de ON sobre la raíz son causados por los altos niveles de ON en el tejido radicular.

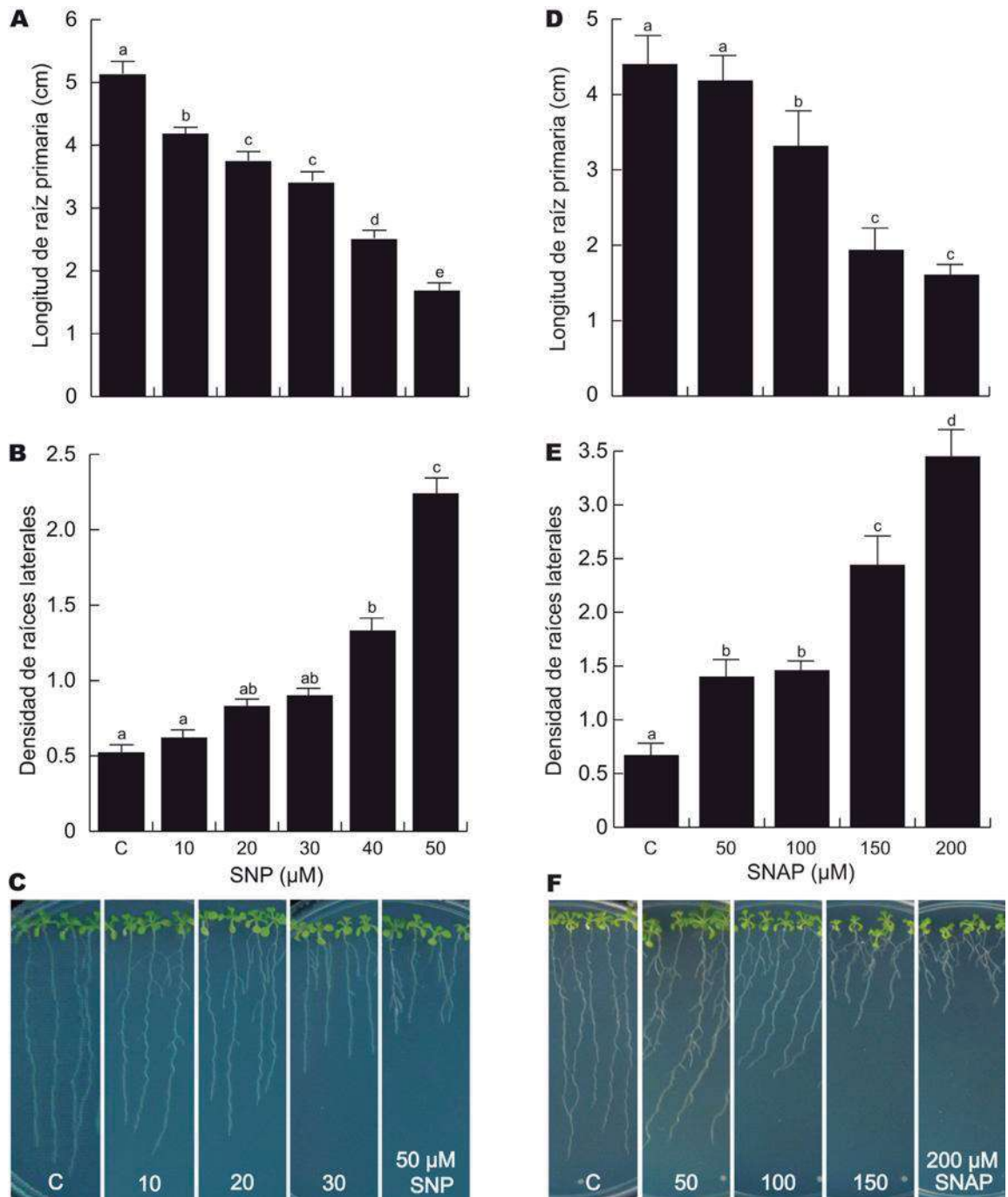


Figura 11. Efecto de los donadores de ON sobre la arquitectura radicular de Arabidopsis.

Plantas silvestres (Col-0) fueron crecidas en las concentraciones indicadas para cada uno de los donadores. (A y D) Longitud de raíz primaria, (B y E) Densidad de raíces laterales, (C y F) Imágenes representativas del efecto en placa de los donadores. Los valores mostrados en A, B, D y E representan la media de 30 plantas \pm error estándar. Letras diferentes se utilizan para denotar las medias que son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$). Las fotografías mostradas en C y F son representativas de al menos tres placas analizadas.

7.8. El donador de ON, SNP activa la iniciación y el crecimiento de primordios de raíces laterales (PRL).

Los PRL son estructuras celulares que representan los diferentes estados del desarrollo en la formación de raíces laterales, originados a partir de células del periciclo. Estas estructuras se encuentran bajo un control hormonal, sin embargo, se desconoce la participación de segundos mensajeros como el ON en su desarrollo. Si bien es cierto que los donadores de ON regulan de manera positiva la formación de raíces laterales en diferentes especies de plantas (Correa-Aragunde *et al.*, 2004, Correa-Aragunde *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2010), se desconoce si el ON actúa estimulando el crecimiento de los PRL, induciendo la formación *de novo* de PRL, o regulando ambos procesos. Para responder esa pregunta se investigó el efecto del SNP sobre la formación de PRL en sus diferentes estados del desarrollo. El análisis de la cuantificación de los PRL se realizó en plántulas silvestres (Col-0) de 7 días de edad tratadas con el solvente o con diferentes concentraciones de SNP 20, 25 y 30 μM , estas concentraciones inhiben el 50% del crecimiento de la raíz primaria e inducen la formación de raíces laterales (Fig. 11A-C). Para realizar el análisis, primeramente las plántulas fueron sometidas a un proceso de clareo con el objetivo de visualizar y cuantificar los PRL, los cuales fueron clasificados en función de su estado de desarrollo descrito por Malamy y Benfey (1997). Todas las concentraciones de SNP incrementan de manera significativa los valores de PRL, principalmente en los estados I-V, los cuales representan los estados de desarrollo temprano (Fig. 12A). Además se analizó la densidad de PRL total (número de PRL / longitud de raíz primaria), la cual también se incrementa en respuesta a los diferentes tratamientos con SNP (Fig.12B). Estos datos sugieren que el ON puede promover la ramificación de la raíz de Arabidopsis, estimulando el crecimiento de PRL pero además induciendo la formación *de novo* de PRL mediante la activación de células del periciclo.

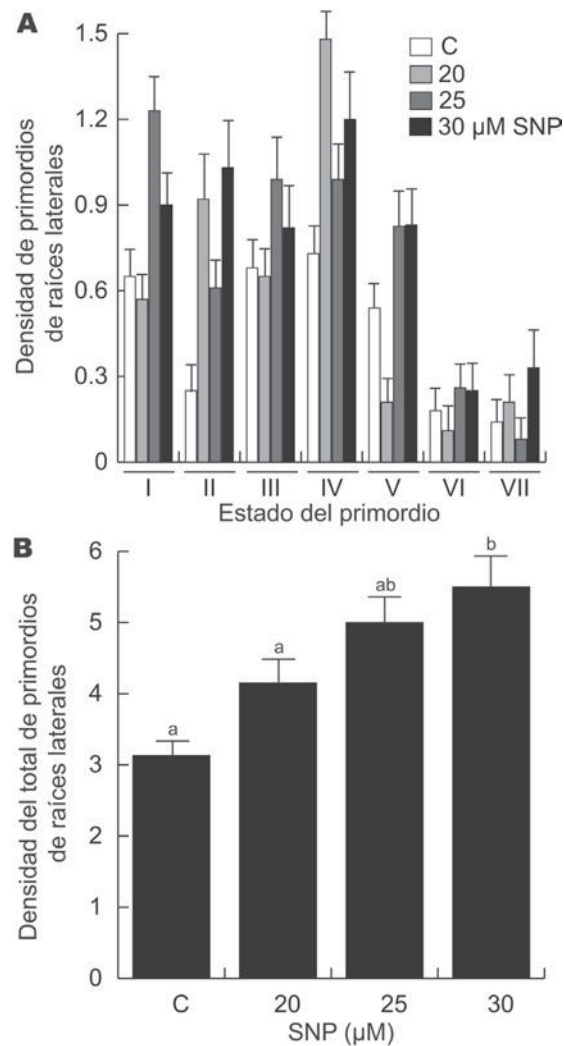


Figura 12. Efectos del ON sobre el crecimiento y formación de PRL. Plantas silvestres (Col-0) fueron crecidas por 7 días en medio con el solvente (control, barras blancas), o en concentraciones crecientes del donador SNP de 20, 25 y 30 μM (barras grises y negras) [A]. (B) Densidad del total de PRL representados en los diferentes estados del desarrollo. El registro de PRL se realizó con base en la clasificación reportada por Malamy y Benfey (1997). Los valores representan la media de 15 plántulas \pm desviación estándar. Letras diferentes denotan las medias que son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

7.9. El ON inhibe el crecimiento de la raíz primaria de Arabidopsis sin comprometer la viabilidad celular.

Para investigar si los efectos inducidos por el SNP sobre la arquitectura radicular de Arabidopsis están regulados por un incremento de los niveles de ON, se determinó la concentración endógena *in situ* del ON en la raíz de plántulas tratadas con el solvente (control) y expuestas a diferentes concentraciones de

SNP de 20, 40 y 60 μM . Este estudio se llevó a cabo por microscopia confocal laser. El SNP alteró la organización celular, provocando un engrosamiento de la zona meristemática de la raíz y activa procesos de división y diferenciación celular evidenciados por la formación de pelos radiculares sobre la zona antes ocupada por el meristemo apical en la raíz primaria y las raíces laterales (Fig. 13A-D, H) y en raíces laterales (Fig. 13E-H). Estos cambios morfológicos sobre el desarrollo correlacionan con un incremento en los niveles de ON, representado por un aumento en la intensidad de la fluorescencia (Fig. 13A-D). Para determinar si los efectos inducidos por el SNP sobre el desarrollo corresponden a respuestas fisiológicas, o son debidas a la toxicidad del SNP en la planta, se analizó la viabilidad celular mediante microscopia confocal en plántulas control y expuestas a SNP, utilizando la línea transgénica *AtHistH2B:YFP* como marcador de DNA celular (Boisnard-Lorig *et al.*, 2001). Previo al análisis, estas plántulas fueron teñidas con ioduro de propidio (IP), un fluorocromo que difunde libremente al interior de la célula cuando ésta se encuentra dañada o muerta (Kirik *et al.*, 2001; Cruz-Ramírez *et al.*, 2004). La expresión del marcador *AtHistH2B:YFP* se evidencia por puntos verdes fluorescentes, lo que indica que cada uno de estos puntos corresponde al núcleo de cada célula. Las plantas transgénicas que expresan el marcador *AtHistH2B:YFP* que fueron tratadas incluso con 60 μM SNP, lograron expresar el marcador a lo largo de la raíz y el IP fue incapaz de internalizarse en la célula lo que indica que las células del meristemo fueron viables (Fig.13I-L). Estos resultados sugieren que los efectos del SNP sobre el desarrollo de la raíz están asociados a cambios en los niveles endógenos de ON, sin afectar la viabilidad o integridad celular.

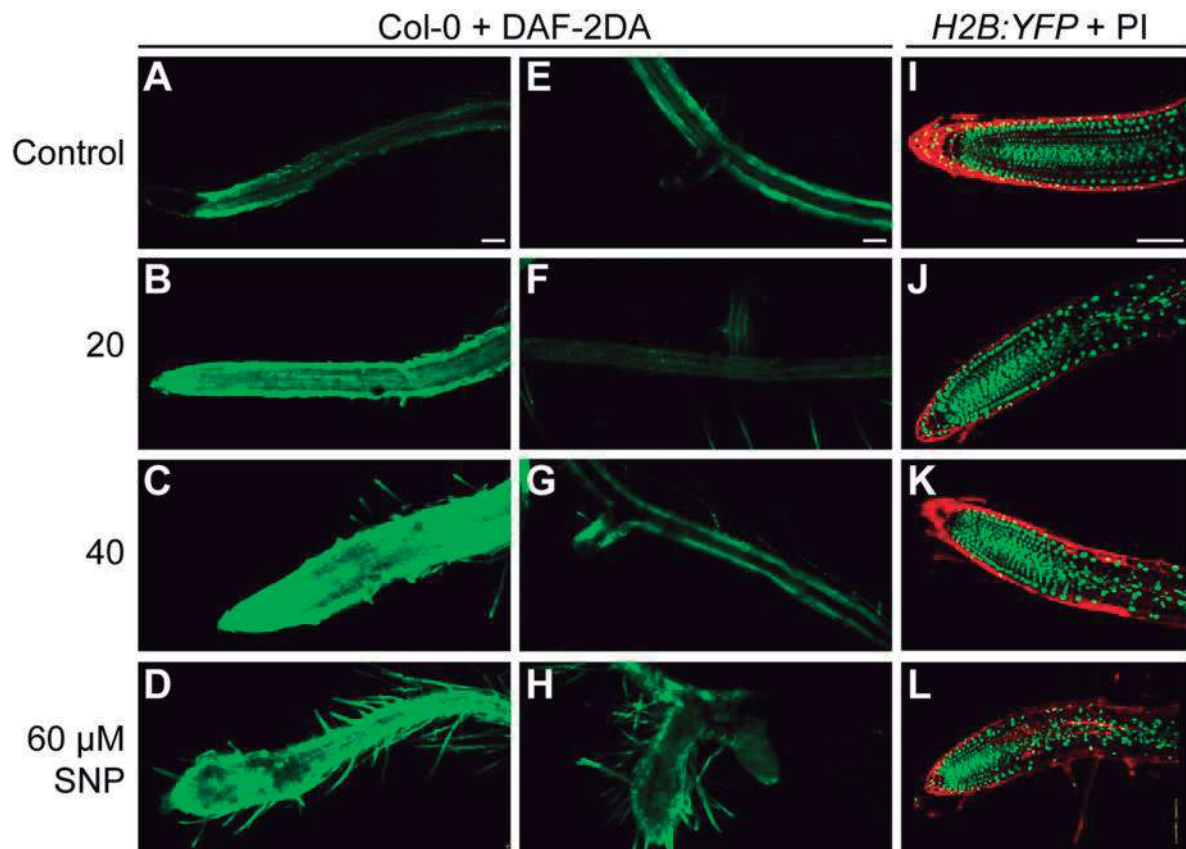


Figura 13. Efectos de los niveles endógenos de ON en la viabilidad celular meristemática y en procesos de diferenciación celular. Plantas silvestres de *Arabidopsis* (Col-0) de 7 días de edad fueron crecidas en las concentraciones indicadas de SNP, y teñidas con DAF-2DA para revelar los niveles endógenos de ON por microscopia confocal, en la raíz primaria (A-D) y en las raíces laterales (E-H). Plantas que expresan el marcador *AtHistH2B:YFP* fueron crecidas bajo las mismas condiciones y teñidas con PI para determinar la estructura y viabilidad celular (I-L). Se analizaron 10 plántulas para cada condición, eligiendo la fotografía más representativa.

7.10. La disminución de los niveles endógenos de ON afecta las respuestas de la *N*-isobutil decanamida en la raíz de *Arabidopsis*.

El encontrar que la *N*-isobutil decanamida incrementa los niveles de ON de manera dependiente de la concentración en raíz primaria de *Arabidopsis* nos motivó a elucidar si estos cambios están involucrados en los efectos de la alcanamida sobre el desarrollo. Uno de los compuestos ampliamente utilizados para estudiar la señalización del ON en plantas es el 2-(carboxyfenil)-4,4,5,5-tetramethylimidazolina-1-oxil-3-oxido (cPTIO), el cual es un agente que oxida al ON para inactivarlo. Con el uso de este inhibidor en ensayos de transferencia, se

evaluó la participación del ON sobre la regulación de la arquitectura radicular en respuesta a la *N*-isobutil decanamida. Plántulas silvestres (Col-0) fueron germinadas y crecidas durante 5 días en medio MS 0.2x y posteriormente transferidas a medio con solvente (control), 100 μ M cPTIO, 25 μ M *N*-isobutil decanamida o *N*-isobutil decanamida + 100 μ M cPTIO. Los cambios inducidos por la alcanamida en la arquitectura radicular fueron cuantificados 3 días después de la transferencia. El crecimiento de las plántulas en condiciones control y en presencia del cPTIO fue similar, contrario a las plántulas transferidas a medio con *N*-isobutil decanamida, donde se observó un arresto del crecimiento de la raíz primaria y un aumento en la formación de raíces laterales (Fig. 14A-C). Las plántulas transferidas a medio con la alcanamida suplementada con el cPTIO, presentaron un mayor crecimiento de la raíz primaria y menor número de raíces laterales, lo que indica que la disminución de los niveles endógenos de ON bloquea parte del efecto de la alcanamida sobre el desarrollo (Fig.14A-C). Esto nos sugiere que el ON está involucrado en el crecimiento de la raíz primaria en respuesta a *N*-isobutil decanamida.

Para entender más a detalle la participación del ON sobre la formación de raíces laterales en respuesta a *N*-isobutil decanamida, se analizó el efecto de la alcanamida en la formación de PRL, sobre la región distal de la raíz primaria. Como se muestra en la figura 14 D, las plántulas tratadas con el solvente o con cPTIO no formaron PRL visibles en esta región de la raíz analizada. Contrario a esto, el número de PRL dramáticamente se incrementó en plántulas transferidas a 25 μ M *N*-isobutil decanamida. El aumento de la formación de PRL y la emergencia de raíces laterales fue bloqueado cuando el cPTIO se aplicó junto con la alcanamida (Fig. 14B, D). Estos resultados sugieren que el ON endógeno está involucrado en la formación de PRL activado por la *N*-isobutil decanamida.

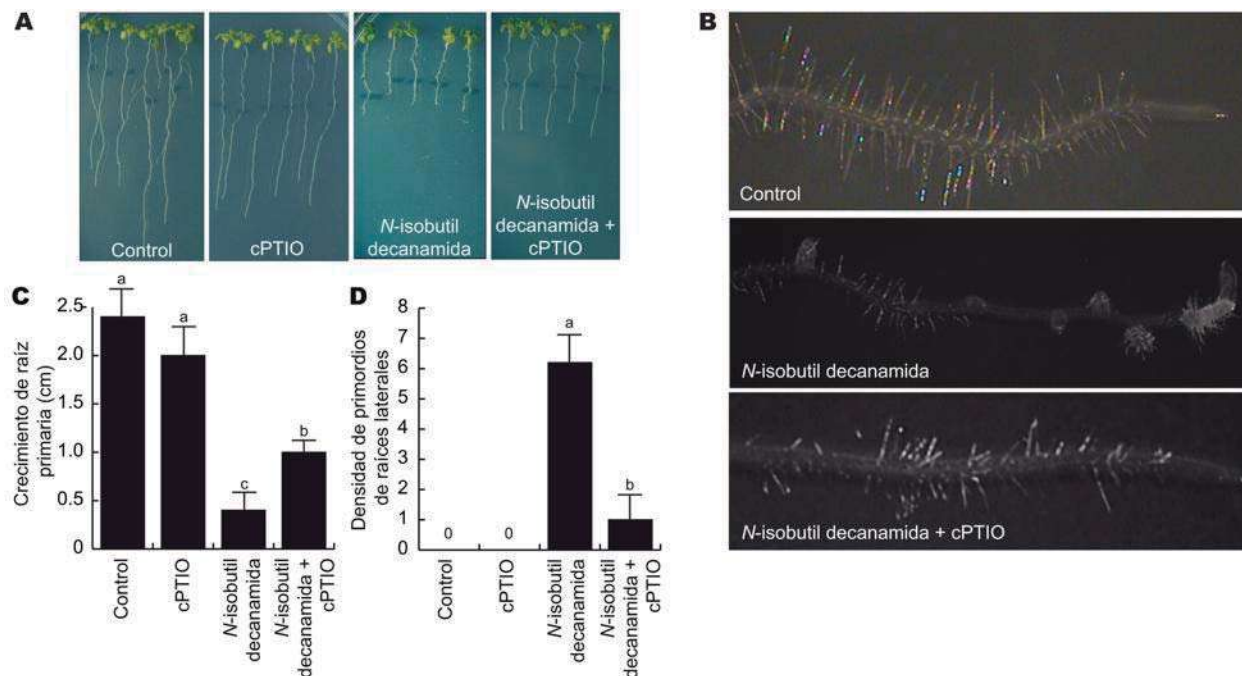


Figura 14. Efecto de la disminución del ON endógeno sobre la arquitectura radicular en respuesta a *N*-isobutil decanamida. Plantas silvestres (Col-0) de *Arabidopsis* de 5 días de edad fueron transferidas por 3 días a medio con el solvente (control), con 100 μ M del compuesto oxidante de ON, cPTIO, con 25 μ M *N*-isobutil decanamida o con cPTIO y *N*-isobutil decanamida. (A) Efectos visuales de los tratamientos sobre el crecimiento de la raíz primaria, después de la transferencia. (B) Amplificación estereoscópica de la zona crecida de la raíz primaria después de la transferencia, notar la ausencia de raíces laterales pequeñas cuando se aplicó el cPTIO con la alcanamida. (C) Crecimiento de raíz primaria y densidad de PRL después de la transferencia (D). Las fotografías mostradas en A son representativas de al menos 3 placas analizadas (n=15). Letras diferentes fueron usadas para medias estadísticamente diferentes.

7.11. Genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis del ON determinan parcialmente la respuesta de *N*-isobutil decanamida en *Arabidopsis*.

Una de las herramientas más importantes que ayudan a investigar y entender mecanismos de señalización celular, es la genética, principalmente mediante la identificación y caracterización de mutantes. Para determinar la participación de genes asociados a la biosíntesis de ON, se analizó el sistema radicular de plantas silvestres (Col-0), la mutante sencilla *Atnoa1* y la doble mutante *nia1 nia2* crecidas en presencia de 30 μ M SNP o *N*-isobutil decanamida. Mediante ensayos de transferencia, se evaluó la respuesta. Primeramente, las

líneas silvestres y mutantes fueron germinadas y crecidas por 5 días en medio MS 0.2x y transferidas a medio que contenía el solvente (control), o a tratamientos con SNP y *N*-isobutil decanamida. Cuatro días después de la transferencia se cuantificó el crecimiento de la raíz primaria y la formación de raíces laterales. En condiciones control, las líneas mutantes *Atnoa1* y *nia1 nia2* presentaron un menor crecimiento de la raíz primaria comparado con las plantas silvestres. Se encontró que ambas líneas mutantes presentaron una sensibilidad similar al SNP y a *N*-isobutil decanamida en la inhibición del crecimiento de raíz primaria (Fig. 15A), lo que indica que esta inhibición causada por el SNP y la alcanida puede ser independiente de la producción de ON por la actividad de las NRs y *AtNOA1*. Interesantemente, cuando se analizó la formación de raíces laterales, las dos líneas mutantes *Atnoa1* y *nia1 nia2* mostraron un menor número de raíces laterales en respuesta a *N*-isobutil decanamida (Fig. 15B, C), indicando que los genes *NIA1*, *NIA2* y *AtNOA1* podrían participar en la producción de ON para la inducción de raíces laterales en respuesta a la alcanida.

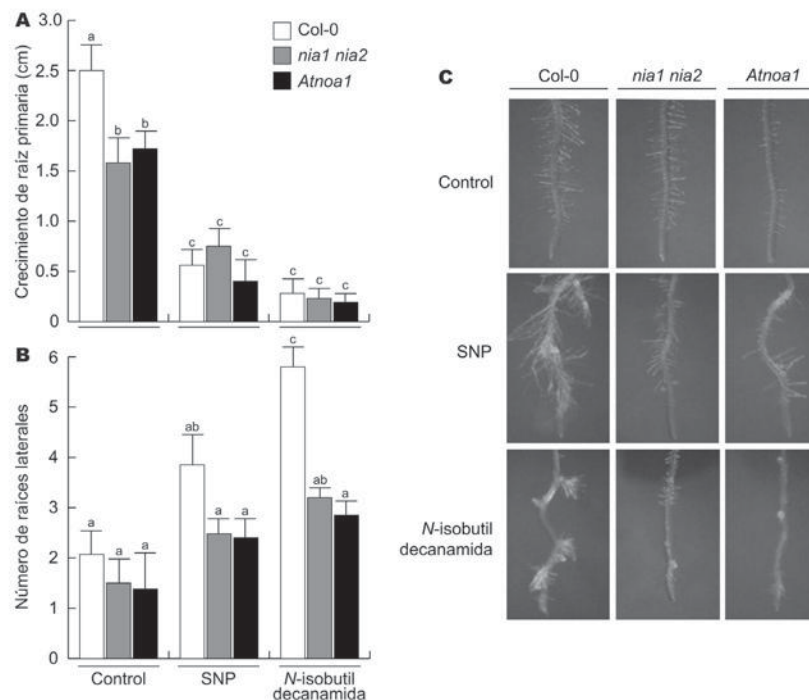


Figura 15. Efectos de *N*-isobutil decanamida sobre la arquitectura radicular de mutantes de *Arabidopsis* afectadas en la biosíntesis de ON. Plántulas silvestres (Col-0) y las mutantes *nia1 nia2* y *Atnoa1* fueron crecidas y germinadas en medio MS 0.2x por 5 días y transferidas a medio con el solvente (control), con 30 μ M de SNP o *N*-isobutil decanamida (n=15 plantas).

7.12. La mutante resistente a alcaloides, *drr1*, mostró resistencia parcial a los efectos del donador de óxido nítrico, SNP sobre el desarrollo de raíces laterales.

Además de los estudios farmacológicos, los cuales indican la participación del ON sobre el desarrollo en respuesta a *N*-isobutil decanamida, se determinó a nivel genético la interacción entre la vía de señalización del ON y la de alcaloides, mediante el uso de la mutante resistente a *N*-isobutil decanamida *drr1*, la cual previamente fue caracterizada por nuestro grupo (Morquecho-Contreras *et al.*, 2010). Se investigó el efecto del donador de ON, SNP, sobre la arquitectura radicular de plantas silvestres (*Ws*) y la mutante *drr1*. Las semillas de las dos líneas fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2x con el solvente (control) y concentraciones crecientes de SNP. El crecimiento de la raíz primaria fue inhibido en las dos líneas, sin embargo, la línea mutante *drr1* mostró una resistencia parcial a la inhibición, si la comparamos con plántulas *Ws* (Fig. 16A). El SNP incrementó la densidad de raíces laterales en plantas silvestres hasta 3 veces en concentraciones de 10 y 20 μM , respectivamente, mientras que la línea mutante *drr1*, estando presente aún en concentraciones de 30 y 40 μM SNP, los valores de la densidad de raíces laterales son diferentes a los presentados por plantas *Ws*, mostrando resistencia la mutante *drr1* a la formación de raíces laterales en respuesta a SNP (Fig. 16B).

Para profundizar en el análisis sobre la participación del locus *DRR1* en la formación de raíces laterales en respuesta al ON, se estudió el efecto del donador SNP sobre la formación de PRL en plantas silvestres *Ws* y la mutante *drr1*. Se analizaron plántulas de 7 días de edad de las dos líneas germinadas y crecidas en medio con solvente (control) o 30 μM SNP. El SNP incrementó 3 veces la densidad de PRL del estado I en plántulas *Ws* comparado con plántulas crecidas en condiciones control (Fig. 16C). Interesantemente, la mutante *drr1* fue insensible al efecto inductor del SNP sobre la densidad de PRL, principalmente en los estados de desarrollo tempranos (Fig. 16C). Analizando la densidad de raíces laterales emergidas en el mismo ensayo, el SNP incrementó significativamente la densidad de raíces laterales en las dos líneas, sin embargo, los niveles de

inducción en la mutante nunca alcanzaron los valores presentados por las plantas silvestres (Fig. 16D). Esto indica que el locus *DRR1* participa en la modulación del crecimiento de la raíz primaria, en formación de raíces laterales a nivel de la activación de células del periciclo así como también acelerando el desarrollo de PRL en respuesta al ON, lo que sugiere una interacción de la vía de señalización de alcaloides y ON.

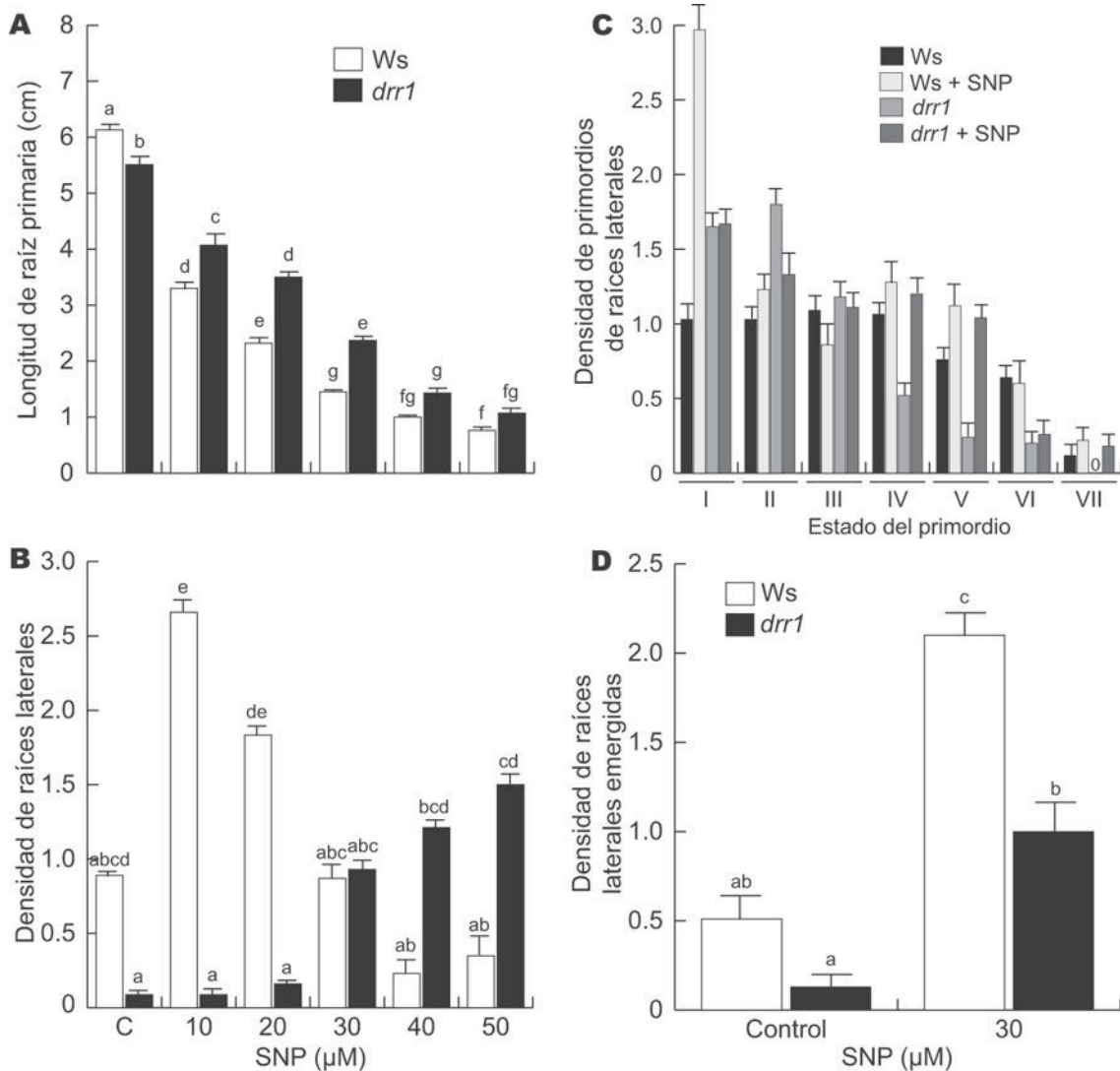


Figura 16. Efectos del ON sobre la arquitectura radicular de la mutante resistente a *N*-isobutil decanamida, *drr1*. (A) Longitud de la raíz primaria y densidad de raíces laterales (B) de plantas de 10 días de edad, germinadas y crecidas en las concentraciones indicadas de SNP. Efecto del SNP sobre la formación de PRL (C) y raíces laterales emergidas (D) en plántulas de 7 días de edad. El registro y la clasificación de PRL se realizó con base en el método reportado por Malamy y Benfey (1997). Letras diferentes denotan medias estadísticamente distintas ($P < 0.05$).

7.13. El locus *DRR1* participa en el mecanismo de señalización del ON.

La *N*-isobutil decanamida modifica la arquitectura radicular de *Arabidopsis*, acompañado por un incremento en los niveles de ON endógeno, efecto similar presentado por donadores de ON. Estas respuestas sobre el desarrollo fueron menos evidentes en la mutante *drr1*. Para determinar si la resistencia mostrada por la mutante *drr1* a *N*-isobutil decanamida y SNP, era a nivel de producción o de percepción de ON, se analizaron los niveles de ON mediante microscopia confocal en plántulas silvestres (*Ws*) y la línea mutante *drr1*. En la figura 17, se muestra cómo en condiciones control, en respuesta al donador SNP y a *N*-isobutil decanamida, los niveles de ON endógeno entre las dos líneas fueron muy similares, lo que nos indica que la mutante *drr1* no está afectada en la producción de ON. Por el contrario, esta mutante posiblemente está alterada en algún componente de la vía de señalización de ON, confiriéndole resistencia al donador SNP y a *N*-isobutil decanamida.

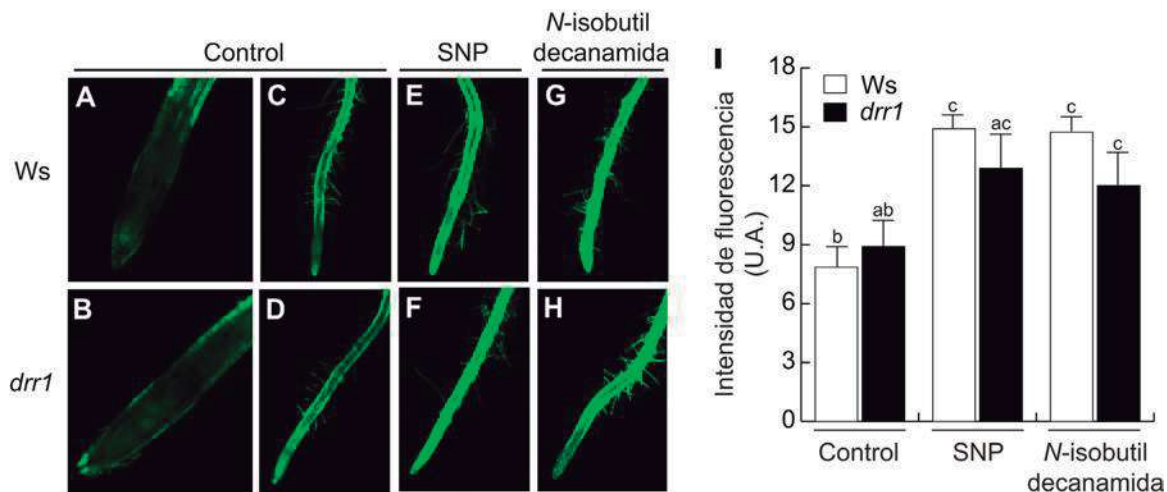


Figura 17. Niveles endógenos de ON en plántulas silvestres (*Ws*) y en la mutante *drr1*. Plantas de 7 días de edad fueron germinadas y crecidas en medio con el solvente (control, A-D), 30 μ M SNP (E y F) o 30 μ M *N*-isobutil decanamida (G y H). Imágenes representativas fueron capturadas por microscopia confocal laser. (I) Cuantificación de la fluorescencia emitida por el DAF-2T en las raíces. La escala de la gráfica esta expresada en unidades arbitrarias. Letras diferentes representan medias estadísticamente distintas ($P < 0.05$).

7.14. Las alcanidas y el ON actúan independiente o cascada abajo de la señalización por auxinas para inducir la formación de raíces laterales.

Las auxinas actúan como señales endógenas para regular numerosos procesos del desarrollo, como es la formación de raíces laterales, proceso organogénico que se lleva a cabo mediante la activación de la división, elongación y diferenciación celular. Para determinar si las alcanidas y el ON estimulan la formación de raíces laterales a través de la señalización por auxinas, se evaluaron los niveles de expresión de dos marcadores de respuesta a auxinas *DR5:uidA* (Ulmasov *et al.*, 1997) y *BA3:uidA* (Oono *et al.*, 1998). Primeramente, se evaluó fenotípicamente el efecto de los diferentes compuestos en plantas silvestres (Col-0), encontrándose que 0.125 μM AIA, 30 μM SNP o *N*-isobutil decanamida inhiben aproximadamente el 50% el crecimiento de la raíz primaria (Fig. 18A). Las plántulas crecidas en condiciones control y en presencia de los compuestos fueron clarificadas para realizar un análisis de PRL. EL AIA, SNP y la *N*-isobutil decanamida incrementaron de manera similar el número de PRL, principalmente en los estados de desarrollo tempranos (Fig. 18B). Sin embargo, cuando se analizaron los niveles de expresión de los marcadores *DR5:uidA* y *BA3uidA*, el tratamiento con 0.125 μM AIA claramente se indujo la expresión de los dos marcadores de respuesta a auxinas, mientras que 30 μM SNP o *N*-isobutil decanamida no indujeron los marcadores, presentando éstos una expresión similar a la observada en condiciones control (Fig. 18C). Aunque estos resultados indican que las tres moléculas tienen la capacidad de activar células del periciclo para inducir la formación de raíces laterales, las alcanidas y el ON pueden estar actuando de forma independiente o cascada abajo en la respuesta a auxinas para promover la formación de PRL.

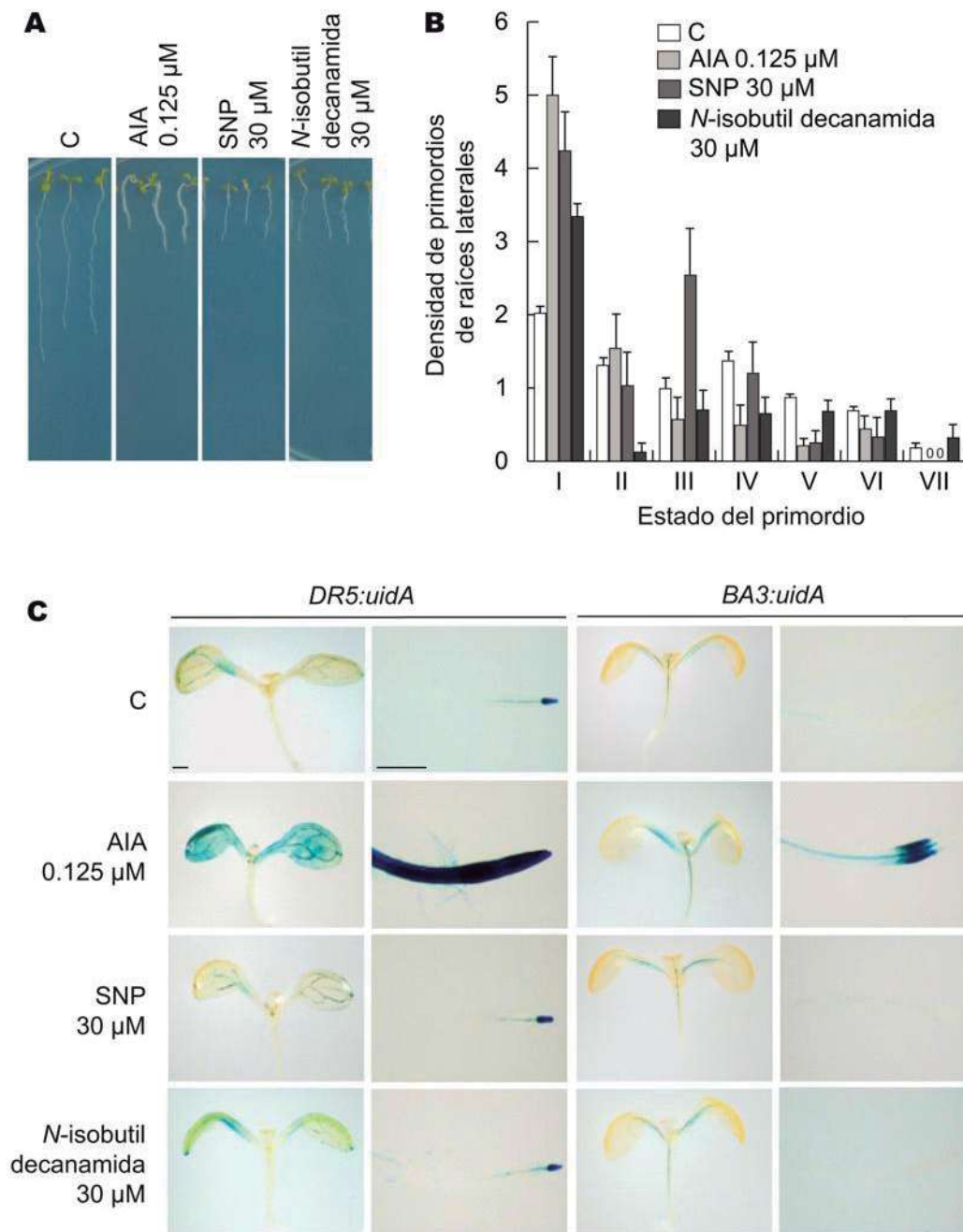


Figura 18. Efecto comparativo del AIA, SNP y *N*-isobutil decanamida sobre la arquitectura radicular y la expresión de marcadores de genes de respuesta a auxinas. (A) Plantas silvestres (*Col-0*) de 7 días de edad fueron crecidas en presencia de los diferentes compuestos. (B) Efecto de los compuestos sobre la formación de PRL. (C) Doce horas de tinción GUS de plántulas de *Arabidopsis DR5:uidA* y *BA3:uidA* crecidas durante 6 días en medio MS 0.2x y transferidas por 24 horas a medio líquido MS 0.2x únicamente (control) o suplementado con 0.125 μ M AIA, 30 μ M SNP o *N*-isobutil decanamida. Los valores mostrados en B son la media de un total de 15 plantas analizadas. Las fotografías en C son representativas de al menos 15 plántulas teñidas.

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

El sistema radicular de las plantas es el resultado de la ramificación y del crecimiento continuo de la raíz y la respuesta a señales ambientales, tales como la disponibilidad de agua, nutrientes, estrés térmico, por sequía o salino. El crecimiento de la raíz primaria y la formación de raíces laterales y pelos radiculares afectan el transporte de agua y nutrientes (López-Bucio *et al.*, 2003; Malamy 2005). El AIA se ha considerado como la molécula principal que regula el crecimiento y desarrollo de las plantas, específicamente el sistema radicular, sin embargo, en años recientes se han descubierto nuevas moléculas señal, tales como las alcaloides y el óxido nítrico, que al igual que el AIA, pueden inducir cambios morfogénéticos sobre el sistema radicular, convirtiéndose en un campo activo de investigación. El AIA induce cambios morfológicos en la raíz mediante la formación de nuevos meristemas de raíces laterales, a través de la activación de células del periciclo de la raíz primaria, así como también la formación de pelos radiculares. Recientemente, se han caracterizado un gran número de genes que participan en el transporte y la señalización de auxinas. Sin embargo, se desconocen los mecanismos moleculares que regulan la formación de raíces laterales y pelos radiculares en respuesta a otras moléculas promotoras como las alcaloides y el óxido nítrico (Nibau *et al.*, 2008; Ortiz-Castro *et al.*, 2008; Morquecho-Contreras *et al.*, 2010).

En este trabajo, se investigó la participación del óxido nítrico en procesos de formación y crecimiento de pelos radiculares, así como su relación con la alcaloide, *N*-isobutil decanamida para regular la arquitectura radicular en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Gran parte del conocimiento que se tiene sobre la función del óxido nítrico en plantas, se ha conseguido mediante estudios farmacológicos, con el uso de agentes que liberan óxido nítrico, como el SNP y SNAP, agentes oxidantes específicos de óxido nítrico como el cPTIO, e indicadores fluorescentes, como el DAF-2DA, un fluorocromo que se une de manera específica al óxido nítrico, lo que permite revelar su localización y concentración (Kojima *et al.*, 1998). Mediante estas herramientas se lograron

determinar los niveles endógenos de óxido nítrico en la raíz primaria de *Arabidopsis*, siendo evidente su acumulación en la zona de la cofia y en la zona de diferenciación celular, incluso en los propios pelos radiculares (Fig. 6). Cuando se aplicó el óxido nítrico de manera exógena, se observó un efecto promotor en procesos de iniciación y crecimiento de pelos radiculares. Este efecto correlacionó con un incremento de la fluorescencia correspondiente a los niveles de óxido nítrico endógeno (Figs. 7 y 8). La iniciación y crecimiento de los pelos radiculares se encuentra bajo estricto control genético, en los que participan genes que codifican las expansinas *AtEXP7* y *AtEXP18* (Cho y Cosgrove, 2002). Las expansinas son enzimas que degradan la pared celular de los tricoblastos permitiendo el crecimiento de los pelos radiculares. Al igual que la auxina AIA, el óxido nítrico fue capaz de inducir la expresión del marcador molecular *EXP7:uidA* (Fig. 8). Estos resultados sugieren que el óxido nítrico actúa como un regulador positivo en procesos de diferenciación celular para activar el crecimiento de los pelos radiculares.

Hasta la fecha, un número limitado de mutantes relacionadas a ON han sido reportadas. Estas incluyen *Atnoa1*, la cual está afectada en una cGTPasa, y *nia1 nia2*, una doble mutante afectada en las dos nitrato reductasas de *Arabidopsis*. En medio con el solvente (control), las dos líneas mutantes mostraron un menor número y longitud de los pelos radiculares comparado con plántulas silvestres, efecto asociado a la deficiencia en la producción de ON (Fig. 9). En medio con SNP las líneas mutantes presentaron una respuesta similar que las plántulas silvestres en procesos de formación y crecimiento de pelos radiculares, indicando que las líneas mutantes no están afectadas en procesos de percepción o señalización al ON (Fig. 9).

La *N*-isobutil decanamida es una molécula que se encuentra en una gran diversidad de especies de plantas. Se ha encontrado que este compuesto inhibe el crecimiento de la raíz primaria, estimula la formación de raíces laterales (López-Bucio *et al.*, 2007) y raíces adventicias, efecto acompañado por un incremento en los niveles de ON (Campos-Cuevas *et al.*, 2008). En este trabajo se encontró que tratamientos de 12.5 a 50 μ M de *N*-isobutil decanamida, inducen una intensa

fluorescencia, correspondiente a los niveles de ON en la raíz primaria, la cual fue asociada a la inhibición del crecimiento de la raíz primaria e inducción en la formación de raíces laterales (Fig.10). Además, se encontró que dos donadores de óxido nítrico, SNP y SNAP, mimetizan los efectos de la *N*-isobutil decanamida sobre el sistema radicular de *Arabidopsis* (Figs. 11 y 12). En los ensayos, el SNP tuvo mayor actividad que el SNAP en la inhibición de la raíz primaria. Este efecto puede ser explicado debido a que el SNP libera otras moléculas como HCN. Sin embargo, al evaluar el efecto del KFeCN, este compuesto inhibió tanto el crecimiento de la raíz primaria como la formación de raíces laterales, indicando que al menos la estimulación del SNP en el desarrollo de raíces laterales ocurre independientemente de HCN. Estos datos no solo confirman la participación del ON en la señalización para el desarrollo de raíces laterales como previamente fue reportado (Pagnussat *et al.*, 2002; Correa-Aragunde *et al.*, 2004; Correa-Aragunde *et al.*, 2006) sino también sugiere que el ON participa como segundo mensajero en respuesta a alcanidas, debido a que tratamientos con SNP incrementa la fluorescencia de DAF-2T (Fig. 13) y la disminución endógena de ON bloquea parte de la respuesta a la *N*-isobutil decanamida en el crecimiento de la raíz primaria y en la formación de raíces laterales (Fig. 14).

Para entender la participación del ON en respuesta a *N*-isobutil decanamida a nivel genético, se evaluaron las líneas mutantes *Atnoa1* y *nia1 nia2*, las cuales mostraron un menor crecimiento de la raíz primaria comparado con plantas silvestres en medio con el solvente. Esta alteración en la raíz primaria no pudo ser restaurada por la aplicación exógena de SNP y *N*-isobutil decanamida (Fig. 15). Sin embargo, se encontró que las líneas mutantes presentaron una sensibilidad similar que las plantas silvestres a la inhibición del crecimiento de raíz primaria en respuesta al SNP y a la alcanida (Fig. 15), indicando que este efecto ocurre de manera independiente de la producción de ON por NIA1, NIA2 y AtNOA1. Interesantemente, las mutantes *Atnoa1* y *nia1 nia2* mostraron una menor formación de raíces laterales comparado con plantas silvestres en respuesta a *N*-isobutil decanamida, lo que sugiere que estos genes pueden estar participando para la activación del periciclo en respuesta a la alcanida (Fig. 15B-C). Estos

resultados sugieren que diferentes fuentes de síntesis de ON participan en promover el desarrollo de raíces laterales con funciones potencialmente redundantes. Recientemente, se ha propuesto que la disminución de los niveles de ON en la mutante *Atnoa1*, puede ser el resultado de efectos pleiotrópicos debido a la deficiencia en la síntesis de plástidos (Florez-Pérez *et al.*, 2008; Gas *et al.*, 2009) y no por una acción directa en la síntesis de ON. Los resultados mostrados anteriormente son consistentes con esta hipótesis, debido a que *Atnoa1* en respuesta a la aplicación exógena de SNP o *N*-isobutil decanamida responde de manera similar a plántulas silvestres en el crecimiento de la raíz primaria y formación de raíces laterales. Por lo tanto, es posible que múltiples fuentes biosintéticas de ON estén participando en respuesta a la alcanamida.

Reportes previos mostraron con evidencia genética la importancia de moléculas lipídicas pequeñas como las alcanamidas y AHLs en el desarrollo de raíces laterales, mediante el aislamiento de la mutante resistente a *N*-isobutil decanamida, *drr1*, la cual crecida bajo condiciones normales presenta un crecimiento continuo de la raíz primaria, pero en la que el número de raíces laterales es menor comparado con plántulas silvestres (Morquecho-Contreras *et al.*, 2010). Nuestro trabajo indica que la mutante *drr1*, además de ser resistente a la alcanamida, también mostró menor sensibilidad comparado con plántulas silvestres a tratamientos con SNP en la inhibición del crecimiento de la raíz primaria y la formación de raíces laterales (Fig. 16A y B). Incluso, la mutante fue incapaz de activar la formación *de novo* de PRL en respuesta a SNP (Fig. 16C), indicando que el ON es un modulador de las alcanamidas en la activación de células del periciclo. La fluorescencia emitida por el DAF-2T en plántulas silvestres (Ws) y en la mutante *drr1* en respuesta a SNP y *N*-isobutil decanamida fue similar entre las dos líneas (Fig. 17). Estos resultados indican que la mutante *drr1* no se encuentra afectada en la producción de ON inducido por la alcanamida, sino que posiblemente el locus *DRR1* se encuentra participando como un elemento a nivel de percepción o señalización del ON para la formación de raíces laterales.

Las auxinas son reguladores maestros en la formación de raíces laterales. Pagnussat *et al.* (2002) y Correa-Aragunde *et al.* (2004), reportaron la

participación del ON en la formación de raíces laterales y adventicias en respuesta a auxinas. Sin embargo, resultados previos indican que las auxinas pueden no participar en la regulación del sistema radicular de *Arabidopsis* en respuesta a alcámidas. Esta hipótesis está basada en nuestro estudio de la expresión de marcadores de respuesta a auxinas, *DR5:uidA* y *BA3:uidA* (Fig. 18). Esta evidencia genética y farmacológica apoya al ON como un integrador de diferentes vías de señalización, como son las auxinas y las alcámidas para la regulación de la formación de raíces laterales (Fig. 19). El modelo propuesto en función de los resultados indica que el ON actúa de manera independiente o cascada abajo de la señalización por auxinas, para modular la expresión de genes del ciclo celular en el periciclo a través de la activación de factores transcripcionales, o mediante modificaciones post-traduccionales por procesos de nitración o nitrosilación en el que posiblemente participa el locus *DRR1* como integrador de las diferentes señales.

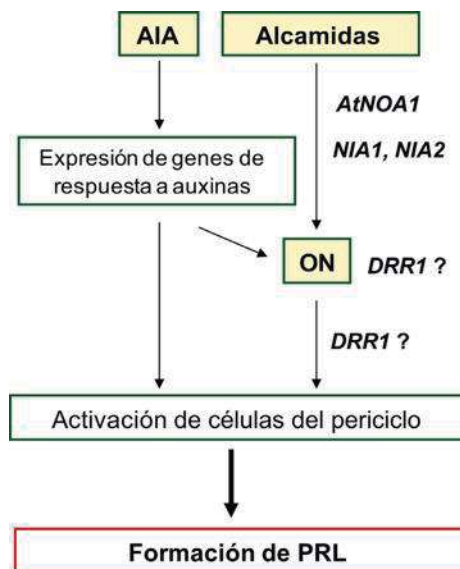


Figura 19. El óxido nítrico participa como un integrador de señales hormonales para la formación de raíces laterales en las plantas. El AIA activa la expresión de genes de respuesta a auxinas (*DR5:uidA*, *BA3:uidA*) en células del periciclo para activar la formación de PRL. Los genes *NIA1*, *NIA2* y *AtNOA1* pueden estar participando en la producción de ON en respuesta a alcámidas. El donador de óxido nítrico SNP y la *N*-isobutil decanamida son incapaces de inducir la expresión de los marcadores de genes de respuesta a auxinas (Fig. 18); por lo tanto, posiblemente el ON actúa cascada abajo de la señalización por auxinas para promover la formación de raíces laterales. *DRR1* participa como elemento a nivel de percepción o de señalización del ON para la activación de células del periciclo y formación de raíces laterales en respuesta a las alcámidas.

9. LITERATURA CITADA.

Badescu G.O. and Napier R.M. (2006). Receptors for auxin: will it all end in TIRs?. *Trends Plant Sci.* 11:217–223.

Baum S.F. and Rost T.L. (1996). Root apical organization in *Arabidopsis thaliana*. 1. Root cap and protoderm. *Protoplasma.* 192:178-188.

Beligni M.V. and Lamattina L. (2001). Nitric oxide in plants: The history is just beginning. *Plant Cell Environ.* 24:267–278.

Berger F., Hung C.Y., Dolan L. and Schiefelbein J. (1998b). Control of cell division in the root epidermis of *Arabidopsis thaliana*. *Dev. Biol.* 194:235-245.

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

Boisnard-Lorig C., Colon-Carmona A., Bauch M., Hodge S., Doerner P. and Bancharel E. (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.

Bright J., Desikan R., Hancock J.T., Weir I.S. and Neill S.J. (2006). ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant J.* 45:113–122.

Campos-Cuevas J.C., Ortiz-Castro R., Méndez-Bravo A., Raya-González J., Pelagio-Flores 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.

Cho, H. T. and Cosgrove D.J. (2002). The regulation of *Arabidopsis* root hair initiation and expansin gene expression by development, hormone, and environment factors. *Plant Cell.* 14:3237-3253.

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

Correa-Aragunde N., Graziano M., Chevallier C. and Lamattina L. (2006). Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. *J. Exp. Bot.* 57:581-588.

Crawford N.M., Galli M., Tischner R., Heimer Y.M., Okamoto M. and Mack A. (2006). Response to Zejmotel *et al.*: Plant nitric oxide synthase: back to square one. *Trends Plant Sci.* 11:526-527.

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

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

Desikan R., Griffiths R., Hancock J. and Neill S. (2002). A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:16314–16318.

Desikan R., Cheung M.K., Bright J., Henson D., Hancock J.T. and Neill S.J. (2004). ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *J. Exp. Bot.* 55:205–12.

Dolan L., Janmaat K., Willemsen V., Linstead P., Poethig S., Roberts K. and Scheres B. (1993). Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development.* 119:71-84.

Flores-Pérez U., Sauret-Gueto S., Gas E., Jarvis P. and Rodríguez-Concepción M. (2008). A mutant impaired in the production of plastome-encoded proteins uncovers a mechanism for the homeostasis of isoprenoid biosynthetic enzymes in *Arabidopsis* plastids. *Plant Cell.* 20:1303–1315.

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

García-Mata C. and Lamattina L. (2002). Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. *Plant Physiol.* 128:790-792.

- Garcia-Mata C., Gay R., Sokolovski S., Hills A., Lamattina L. and Blatt M.R.** (2003). Nitric oxide regulates K⁺ and Cl⁻ channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:11116-11121.
- Gas E., Flores-Pérez U., Sauret-Gueto S. and Rodríguez-Concepción M.** (2009). Hunting for plant nitric oxide synthase provides new evidence of a central role for plastids in nitric oxide metabolism. *Plant Cell.* 21:18–23.
- Goldstein S., Russo A. and Samuni A.** (2003). Reactions of PTIO and carboxy-PTIO with NO, NO₂ and O₂. *J. Biol. Chem.* 278:50949-50955.
- Gray W.M.** (2004). Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS Biol.* 2:12701273.
- 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.
- Grün S., Lindermayr C., Sell S. and Durner J.** (2006). Nitric oxide and gene regulation in plants. *J. Exp. Bot.* 57(3):507-516.
- Guilfoyle T.J. and Hagen G.** (2007). Auxin response factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10:453–460.
- Guo F.Q., Okamoto M. and Crawford N.M.** (2003). Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signalling. *Science.* 302:100–103.
- Hanafy K.A., Krumenacker J.S. and Murad F.** (2001). NO, nitrotyrosine, and cyclicGMP in signal transduction. *Med. Sci. Mon.* 7:801–819.
- Hasenstein K.H. and Evans M.L.** (1988). The effect of cations on hormone transport in primary roots of *Zea mays*. *Plant Physiol.* 86: 890-894.
- He Y., Tang R.H., Hao Y., Stevens R.D. and Cook C.W.** (2004). Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science.* 305:1968–1971.
- Hofer R.M.** (1991). Root hairs. In: *Plant Roots The Hidden Half*, Y. Waisel, A. Eshel, and U. Kafkafi, eds., pp 129-148.
- Hu X., Neill S., Tang Z. and Cai W.** (2005). Nitric oxide mediates gravitropic bending soybean roots. *Plant Physiol.* 137:663-670.

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

Ishikawa H. and Evans M.L. (1990). Stimulation of root growth by mechanical impedance is independent of the root cap (abstract No. N-14). *Am. SOC Gravi. S. Biol. Bull.* 4:105.

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

Kirik V., Bouyer D., Schobinger V., Bechtold N., Herzog M. and Beneville J.M. (2001). *CPR5* is involved in cell proliferation and cell death control and encodes a novel transmembrane protein. *Curr. Biol.* 11:1891–1895.

Kojima H., Nakatsubo N., Kikuchi K., Kirino Y., Nahoshi H. and Hirata Y. (1998). Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diamino fluoresceins. *Analysis Chem.* 70:2446–2453.

Kone B.C., Kunczewicz T., Zhang W. and Yu Z.Y. (2003). Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 285:178–90

Lamattina L. (2005). Oxido Nítrico: El Gas Mágico que Comienza a Unir Algunas Piezas Sueltas en la Biología de las Plantas.

Lea U.S., ten Hoopen F., Provan F., Kaiser W.M., Meyer C. and Lillo C. (2004). Mutation of the regulatory phosphorylation site of tobacco nitrate reductase results in high nitrite excretion and NO emission from leaf and root tissue. *Planta.* 219:59–65.

Lee M.M. and Schiefelbein J. (2002). Cell pattern in the Arabidopsis root epidermis determined by lateral inhibition with feedback. *Plant Cell.* 14:611–618.

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

López-Bucio J., Cruz-Ramírez A. and Herrera-Estrella L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture . *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:280–287.

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

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

Malamy J. (2005). Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell Environ.* 28:67–77.

Malamy J.E. and Benfey P.N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development.* 124:33–44.

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

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

Molina-Torres J. and García-Chávez A. (2001). Alcamidas en plantas: Distribución e importancia. *Avance y Perspectiva* 12:23-29.

Moreau M., Lee G.I., Wang Y., Crane B.R. and Klessig D.F. (2008). *AtNOS1/AtNOA1* is a functional *Arabidopsis thaliana* cGTPase and not a nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 283:32957-32967.

Morquecho-Contreras A. and López-Bucio J. (2007). Cannabinoid-like signaling and other new developmental pathways in plants. *Int. J. Plant Dev. Biol.* 1:34-41.

Morquecho-Contreras A and López-Bucio J. Los reguladores del crecimiento vegetal. En: Fronteras en la biología del desarrollo vegetal. Beltrán-Peña E., López-Bucio J. (Eds). UMSNH, (2010) pp. 11-23.

Neill S.J., Desikan R., Clarke A. and Hancock J.T. (2002). Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol.* 128:13-16.

Neill S.J., Desikan R. and Hancock J.T. (2003). Nitric oxide signaling in plants. *New Phytol.* 159:11–35.

Nibau C., Gibbs D.J. and Coates J.C. (2008). Branching out in new directions: the control of root architecture by lateral root formation. *New Phytol.* 179:595–614.

Okada K. and Shimura Y. (1990). Reversible root tip rotation in Arabidopsis seedlings induced by obstacle-touching stimulus. *Science.* 250:274–276.

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.

Ortíz-Castro R., Martínez-Trujillo M. and 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.

Pagnussat G.C., Simontacchi M., Puntarulo S. and Lamattina L. (2002). Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol.* 129:954–956.

Pagnussat G.C., Lanteri M.L. and Lamattina L. (2003). Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious initiation through an auxin- and ethylene-associated process. *Plant Physiol.* 106:1335–1346.

Planchet E., Jagadis Gupta K., Sonoda M. and Kaiser W.M. (2005). Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *Plant Cell.* 41(5):732-743

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

Rahman A., Hosokawa S., Oono Y., Amakawa T., Goto N. and Tsurumi S. (2002). Auxin and ethylene response interactions during Arabidopsis root hair development dissected by auxin influx modulators. *Plant Physiol.* 130:1908–17.

- Ramírez-Chávez E., López-Bucio J., Herrera-Estrella L. and Molina-Torres J.** (2004). Alkamides isolated from plants promote growth and alter root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134:1058-1068.
- Rockel P., Strube F., Rockel A., Wildt J. and Kaiser W.M.** (2002). Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *J. Exp. Bot.* 53:103–10.
- Ruegger, M., William M.E., Gray L.G., Turner J. and Estelle M.** (1998). The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast *grr1p*. *Genes Dev.* 12:198–207.
- Santner A. and Estelle M.** (2009). Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. *Nature.* 459:1071-1078.
- Scheres B. and Wolkenfelt H.** (1998). The *Arabidopsis* root as a model to study plant development. *Plant Physiol. Biochem.* 36:21:32.
- Scheres B., Wolkenfelt H., Willemsen V., Terlouw M., Lawson E., Dean C. and Weisbeek P.** (1994). Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. *Development.* 120:2475-2487.
- Schmidt H.H.H.W. and Walter U.** (1994). NO at work. *Cell.* 78:919–25.
- Stohr C., Strube F., Marx G., Ullrich W.R. and Rockel P.** (2001). A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta.* 212:835–41.
- Strader L.C. and Bartel B.** (2008). A new path to auxin. *Nature Chem. Biol.* 4:337–339.
- Stuehr D.J., Santolini J., Wang Z.Q., Wei C.C. and Adak S.** (2004). Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. *J. Biol. Chem.* 279:36167–70.
- Szemenyei H., Hannon M. and Long J.A.** (2008). TOPLESS mediates auxin dependent transcriptional repression during *Arabidopsis* embryogenesis. *Science.* 319:1384-1386.
- Tan X. et al.** (2007). Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* 446:640–645.

- Tanimoto M., Roberts K. and Dolan L.** (1995). Ethylene is a positive regulator of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 8:943–48.
- Teale W.D., Paponov I.A. and Palme K.** (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:847-859.
- 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.
- Vanin A.F., Svistunenko D.A., Mikoyan V.D., Serezhenkov V.A. and Fryer M.J.** (2004). Endogenous superoxide production and the nitrite/nitrate ratio control the concentration of bioavailable free nitric oxide in leaves. *J. Biol. Chem.* 279:24100–24107.
- Vieten A., Sauer M., Brewer P.B. and Friml J.** (2007). Molecular and cellular aspects of auxin transport-mediated development. *Trends Plant Sci.* 12:160–168.
- Wang Y., Ries A., Yang A. and Crawford N.** (2010). The *Arabidopsis* prohibitin gene PHB3 functions in nitric oxide-mediated responses and in hydrogen peroxide-induced nitric oxide accumulation. *Plant Cell.* 22:249–259.
- Weyers J.D.B. and Patterson N.W.** (2001). Plant hormones and the control of physiological processes. *New Phytol.* 152:375-407.
- Wilkinson J.Q. and Crawford N.M.** (1993) Identification and characterization of a chlorate-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* with mutations in both nitrate reductase structural genes *NIA1* and *NIA2*. *Mol. Gen. Genet.* 239:289–297.
- Wilson ID., Neill S.J. and Hancock J.T.** (2008). Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant Cell Env.* 31:622-631.
- Yamasaki H. and Sakihama Y.** (2000). Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett.* 468:89–92.
- Zeidler D., Zähringer U., Gerber I., Dubery I., Hartung T., Bors W., Hutzler P. and Durner J.** (2004). Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 15811–15816.

Zemojtel T., Frohlich A., Palmieri M.C., Kolanczyk M., Mikula I., Wyrwicz L.S., Wanker E.E., Mundlos S., Vingron M., Martasek P. and Durner J. (2006). Plant nitric oxide synthase: A never-ending story? *Trends Plant Sci.* 11, 524-525.

Zhao M.G., Tian Q.Y. and Zhang W.H. (2007). Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 144, 206-217.

10. APÉNDICE.

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

1. Méndez-Bravo A., **Raya-González J.**, Herrera-Estrella L., López-Bucio J. (2010). Nitric oxide is involved in alkamide-induced lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*. 51(10): 1612-1626.

2. Morquecho-Contreras A., Méndez-Bravo A., Pelagio-Flores R., **Raya-González J.**, Ortiz-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. **Raya-González J.**, Beltrán-Peña E., López-Bucio J. (2010). Metabolismo y señalización del óxido nítrico en 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. 115-127.

Nitric Oxide is Involved in Alkamide-Induced Lateral Root Development in Arabidopsis

Alfonso Méndez-Bravo¹, Javier Raya-González¹, Luis Herrera-Estrella² and José López-Bucio^{1,*}

¹Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, CP 58030 Morelia, Michoacán, México

²Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, Cinvestav-Guanajuato. Km. 9.6 Libramiento Norte, Apartado Postal 629, CP. 36821 Irapuato, Guanajuato, México

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

(Received May 27, 2010; Accepted August 2, 2010)

Regular Paper

Alkamides are small bioactive lipid signals with a wide distribution in plants. In this report, the role of nitric oxide (NO) in the alterations induced by *N*-isobutyl decanamide on the Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) root system architecture (RSA) was investigated. We first compared the effects of *N*-isobutyl decanamide and NO donors sodium nitropruside (SNP) and *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP) on root morphogenetic processes. Both *N*-isobutyl decanamide and NO donors modulated RSA in a similar way and in a dose-dependent manner, inhibiting primary root growth and promoting lateral root primordia (LRP) formation. RSA alterations induced by *N*-isobutyl decanamide correlated with NO accumulation in the primary root tip and in developing lateral roots. Morphogenetic effects of *N*-isobutyl decanamide decreased when NO scavengers were supplied to alkamide-treated seedlings. *N*-Isobutyl decanamide-regulated root architectural changes were also investigated in mutants defective in NO biosynthesis, *nia1 nia2*, and NO signalling, *Atnoa1*, and in the alkamide-resistant mutant *drr1*. The *nia1 nia2* and *Atnoa1* mutants were indistinguishable in primary root growth inhibition by the alkamide when compared with wild-type (WT) seedlings, but showed reduced lateral root responses. The *drr1* mutant was less sensitive in both primary root growth inhibition and LRP induction by NO donors than WT seedlings. Detailed DR5:uidA and BA3:uidA marker analysis showed that *N*-isobutyl decanamide and its interacting signals jasmonic acid and NO act downstream or independently of auxin-responsive gene expression to promote LRP formation. Our results provide compelling evidence that NO is an intermediate in alkamide signaling mediating RSA adjustment in Arabidopsis.

Keywords: *N*-Acyl-L-homoserine lactones • Alkamides • *Arabidopsis thaliana* • Nitric oxide • Root development.

Abbreviations: AHL, *N*-acyl-L-homoserine lactone; cPTIO, 2-(carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide; DAF, 4,5-diaminofluorescein; DMSO, dimethylsulfoxide;

GUS, β -glucuronidase; JA, jasmonic acid; LR, lateral root; LRP, lateral root primordia; MB, methylene blue; MS, Murashige and Skoog; NAE, *N*-acyl ethanolamine; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; NR, nitrate reductase; PI, propidium iodide; QC, quiescent center; RSA, root system architecture; SNAP, *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine; SNP, sodium nitropruside; WT, wild type; YFP, yellow fluorescent protein.

Introduction

Coordination of signaling pathways responding to physiological and environmental changes has a central role in plant growth and development. A group of fatty acid amides including alkamides, *N*-acyl ethanolamines (NAEs) and *N*-acyl-L-homoserine lactones (AHLs) have emerged as important modulators of developmental processes (López-Bucio et al. 2006, Ortíz-Castro et al. 2008, Morquecho-Contreras et al. 2010). Plant and bacterial fatty acid amides have been shown to alter root and shoot system architecture in Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) and to affect biomass production in a dose-dependent way (Blancaflor et al. 2003, Ramírez-Chávez et al. 2004, Campos-Cuevas et al. 2008, Ortíz-Castro et al. 2008). Rapid establishment of roots in response to alkamide treatment, whether by proliferation of lateral roots (LRs) or adventitious roots, is advantageous for young seedlings as it increases their ability to anchor themselves to the soil and to obtain water and nutrients. Although application of fatty acid amides to crops may be advantageous, their agricultural potential may increase if the mechanisms of action of these compounds were known.

As a first step in exploring the structure–activity relationships of NAEs and alkamides, López-Bucio and co-workers (2007) reported the root architectural responses of Arabidopsis seedlings to natural and synthetic compounds. From a group of similar chain length alkamides and NAEs, *N*-isobutyl decanamide, a C10 saturated alkamide that is naturally produced in *Acmella radicans* (Ríos-Chávez et al. 2003) and

Plant Cell Physiol. 51(10): 1612–1626 (2010) doi:10.1093/pcp/pcq117, available online at www.pcp.oxfordjournals.org

© The Author 2010. Published by Oxford University Press on behalf of Japanese Society of Plant Physiologists.

All rights reserved. For permissions, please email: journals.permissions@oxfordjournals.org

Cissampelos glaberrima (Laurerio-Rosario et al. 1996), was identified as the most active compound in inhibiting primary root growth and stimulating LR formation. *N*-Isobutyl decanamide was also found to induce adventitious root formation both in shoot explants and in intact *Arabidopsis* seedlings. Stimulation of adventitious root branching was related to an increase in nitric oxide (NO) levels in sites of adventitious root initiation, suggesting a role for NO in alkamide-regulated development processes (Campos-Cuevas et al. 2008).

NO is a highly active gaseous molecule involved in diverse morphogenetic and developmental processes such as xylem differentiation, programmed cell death, LR and adventitious root development, flowering, stomatal closure, gravitropism, leaf expansion, photomorphogenesis and senescence (Beligni and Lamattina 2001, Desikan et al. 2002, Neill et al. 2003, Correa-Aragunde et al. 2004, Grün et al. 2006). NO participates as an integrative signal of diverse endogenous plant hormones including ABA-regulated stomatal closure (Desikan et al. 2002), auxin-mediated LR formation (Pagnussat et al. 2002), jasmonic acid (JA) and cytokinin signaling (Huang et al. 2004, Tun et al. 2008).

In animals, NO is produced by NO synthase (NOS). The sources of NO synthesis in plants include reduction of nitrite by nitrate reductase (NR), oxidation from arginine to citrulline by NOS, and a non-enzymatic NO generation system (Bethke et al. 2004). Although evidence for arginine-dependent NO synthesis has accumulated, no gene or protein with functional similarity to mammalian-type NOS have been found in plants. Guo et al. (2003) identified a NOS-like enzyme from *Arabidopsis* (*AtNOS1*) with a sequence similar to that of a protein that has been implicated in NO synthesis in the snail *Helix pomatia*. However, the *AtNOS1* protein did not show NOS activity, since it was unable to bind and oxidize arginine to NO (Zemojtel et al. 2006, Moreau et al. 2008). Therefore, *AtNOS1* was renamed *AtNOA1* for *NO-associated protein 1* (Crawford et al. 2006). Experimental evidence has shown that *AtNOA1* is a member of the circularly permuted GTPase family (cGTPase) (Moreau et al. 2008). The *Arabidopsis Atnoa1* mutant has been widely used in NO research; it shows reduced levels of NO during plant growth, fertility, hormonal signaling, salt tolerance and plant pathogen responses (Guo et al. 2003, Zeidler et al. 2004, Zhao et al. 2007).

Another source of plant NO results from the activity of the enzyme NR. This enzyme is usually associated with nitrogen assimilation, but can also generate NO from nitrite in an NAD(P)H-dependent reaction (Dean and Harper 1986, Rockel et al. 2002). Such activity can be inhibited by tungstate, which has been used to assess the involvement of NR in potential signaling pathways (Bright et al. 2006). NR is a molybdenum-containing enzyme, and it is assumed that tungstate in some way competitively interferes within the metal-binding site of the enzyme. *Arabidopsis* has two NR genes, *NIA1* and *NIA2*, encoding proteins that are very similar (83.5% identical at the amino acid level), but which differ in a number of specific sequence regions, e.g. the N-terminal region. Using the

double mutant *nia1 nia2*, it has been shown that NR is involved in ABA-induced NO generation in guard cells (Desikan et al. 2002).

Although our previous research has shown that alkamides induce NO accumulation during adventitious root formation in *Arabidopsis* shoot explants (Campos-Cuevas et al. 2008), it is not known whether NO modulates other factors important for root architectural responses such as primary root growth and LR formation. In addition, it is unknown whether NO stimulates LR development by activating pericycle cells to produce more lateral root primordia (LRP) or by stimulating LRP outgrowth to increase the number of mature LRs.

In our previous research, we identified an alkamide-resistant mutant termed *decanamide resistant root 1* (*drr1*), which shows reduced sensitivity to primary root growth inhibition by *N*-isobutyl decanamide (Morquecho-Contreras et al. 2010). The *drr1* line represents a powerful biological tool to explore a potential interaction between alkamides and NO in plant signaling. Here, we show that *N*-isobutyl decanamide induces NO accumulation in meristematic and proliferating root regions in *Arabidopsis* seedlings, and that exogenous application of the NO donors sodium nitropruside (SNP) and *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP) mimics root system architecture (RSA) responses to alkamides. We explored at the genetic level the involvement of *NIA1*, *NIA2* and *AtNOA1* in mediating the RSA responses to *N*-isobutyl decanamide and show that the corresponding genes are important factors in LR formation under alkamide treatment. Moreover, our comparative RSA analysis in wild-type (WT) and *drr1* mutants in response to NO donor treatment provided information indicating that *DRR1* is involved in NO-mediated LR induction. Taken together, our results show that NO may act in mediating root developmental responses to alkamides in *A. thaliana*.

Results

N-Isobutyl decanamide induces NO accumulation in both primary and lateral roots

To determine whether NO could be involved in root architectural responses to alkamides, we analyzed the presence of NO in the *Arabidopsis* root system by using the fluorescent probe 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2DA) in seedlings germinated and grown for 7 d on 0.2× Murashige and Skoog (MS) medium, supplied with different concentrations of *N*-isobutyl decanamide. Living cells incorporate DAF-2DA, which subsequently is hydrolyzed by cytosolic esterases to release 4, 5-diaminofluorescein (DAF-2), which reacts with NO to produce the fluorescent triazole derivative triazolofluorescein (DAF-2T) (Kojima et al. 1998). As previously reported (López-Bucio et al. 2007), this alkamide was found to inhibit primary root growth and increase both LR number and density (number of LRs cm⁻¹) in a dose-dependent way (Fig. 1A–C). We also calculated the LR density induced by the alkamide in the LR formation zone, which comprises the root portion from

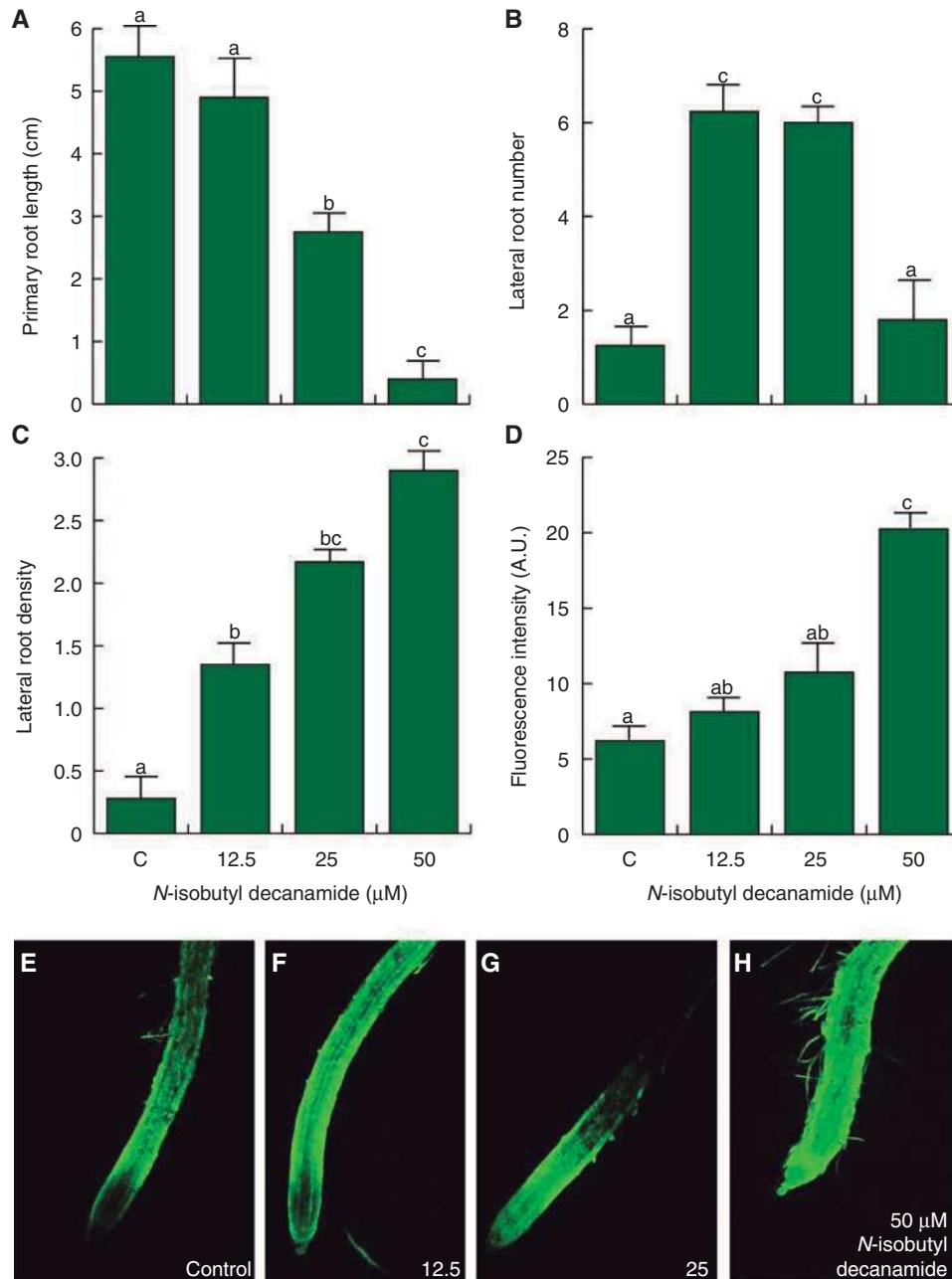


Fig. 1 Effects of *N*-isobutyl decanamide on root architecture and NO accumulation in *Arabidopsis* seedlings. (A) Primary root length, (B) total number of emerged lateral roots and (C) lateral root density (lateral root number per cm) from 7-day-old WT (Col-0) seedlings grown on the indicated concentration of *N*-isobutyl decanamide. (D) DAF-2T fluorescence signals from roots ($n = 10$) were quantified using the ImageJ program. The graph is expressed in arbitrary units. (E–H) Detection of endogenous NO on primary root tips in 7-day-old seedlings with DAF-2DA. Values shown in A, B and C represent the mean of 30 seedlings \pm SE. Different letters are used to indicate means that differ significantly ($P < 0.05$). The experiment was repeated three times with similar results. Photographs are representative individuals of at least 10 seedlings analyzed; bars represent the SD.

the root base to the youngest (most distal) emerged LR as reported by Dubrovsky et al. (2009). In control seedlings the LR formation zone comprised 10 mm in length; a similar length was recorded in *Arabidopsis* seedlings treated with 12.5 μ M

N-isobutyl decanamide. Treatments with 25 and 50 μ M *N*-isobutyl decanamide decreased the LR formation zone length by 45 and 75%, respectively (**Supplementary Fig. S1**). In contrast, all three alkamide treatments clearly increased LR

density (**Supplementary Fig. S1**) confirming the stimulatory effect of the alkamide on LR formation. When *Arabidopsis* seedlings grown in medium with *N*-isobutyl decanamide were loaded with DAF-2DA, specific green fluorescence could be detected by means of confocal microscopy. Interestingly, reduced primary root growth and enhanced LR formation in response to the alkamide correlated with enhanced DAF-2T fluorescence detected in the meristematic region of the primary root tip (**Fig. 1D–H**). In agreement with the strong primary root growth inhibition observed in seedlings treated with 25 and 50 μM *N*-isobutyl decanamide, differentiation processes were induced as revealed by root hair formation close to the primary root tip. Fluorescence was clearly seen in the differentiation region of the primary root, in which root hair formation takes place (**Fig. 1H**). This suggests that increased fluorescence in root tips in response to alkamide treatment probably occurs by NO accumulating in this region.

NO donors mimic the root architectural responses of *Arabidopsis* seedlings to *N*-isobutyl decanamide

A widely used strategy to investigate NO signaling in plant development involves the pharmacological application of NO donors such as SNP or SNAP to emulate NO production (Planchet and Kaiser 2006). To determine whether NO donors could alter RSA in *Arabidopsis* in a similar way to *N*-isobutyl decanamide, *Arabidopsis* WT (Col-0) seedlings were germinated and grown in medium with increasing concentrations of SNP or SNAP, and primary root growth and LR density were determined in 7-day-old seedlings. A dose-dependent primary root growth inhibition was found in seedlings treated with SNP when compared with solvent-treated seedlings (**Fig. 2A**). The number of emerged LRs per seedling increased significantly with 10 and 20 μM SNP treatments (**Fig. 2B**), while LR density increased with SNP treatments (**Fig. 2C**). The overall RSA of SNP-treated seedlings changed depending on the SNP concentration from a long primary root with a low number of LRs to a short and more branched root system (**Fig. 2B, C**).

SNP is a potentially toxic NO donor, since it produces other volatiles such as HCN. Therefore, we determined whether a second NO donor SNAP could alter *Arabidopsis* RSA. Similarly to SNP, exogenous application of SNAP modulated primary root growth and LR formation albeit at higher concentrations than SNP (**Supplementary Fig. S2**). These results indicate that the root morphogenetic effects of NO donors are likely to be due to NO and not HCN accumulation in root tissues.

NO donor SNP affects the stage distribution of LRP and increases LRP density

Although reported information has shown the positive role of NO donors in stimulating LR growth in different plant species (Correa-Aragunde et al. 2004, Correa-Aragunde et al. 2006, Wang et al. 2010), it is uncertain whether NO acts by stimulating LRP growth, inducing de novo formation of LRP or

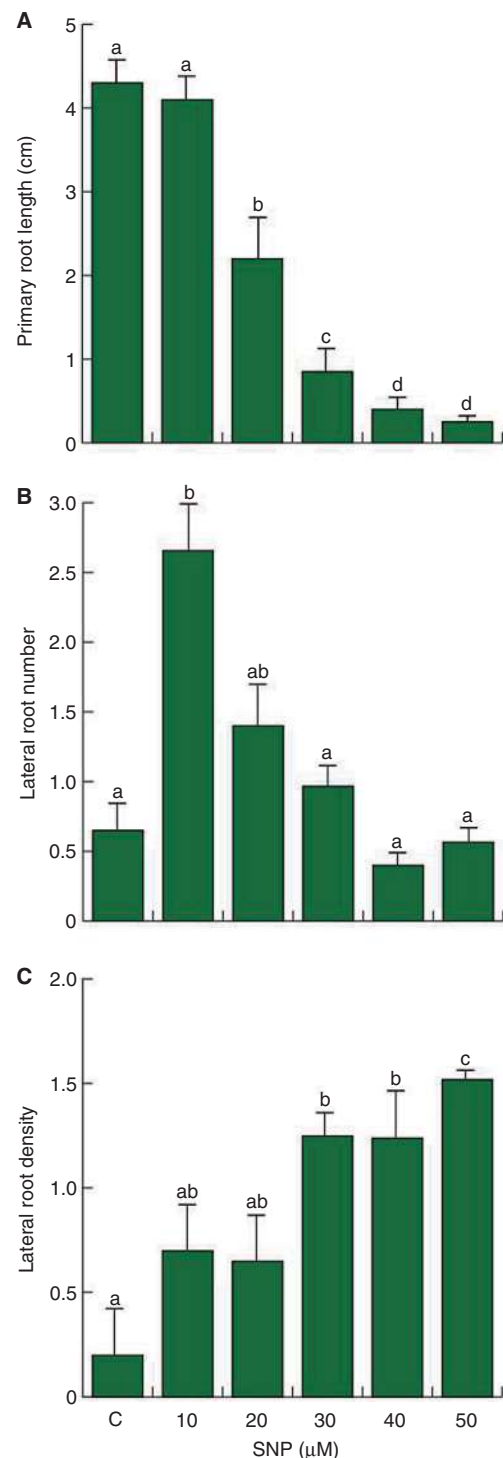


Fig. 2 Effects of NO donor SNP on *Arabidopsis* root system architecture. WT (Col-0) seedlings were grown for 7 d on agar plates supplied with the NO donor SNP at the indicated concentrations. Primary root length (A), lateral root number (B) and lateral root density (C) determined for a total of 30 seedlings. Data in A and B show the mean \pm SD of 30 plants analysed. Different letters are used to indicate means that differ significantly ($P < 0.05$). The experiment was repeated three times with similar results.

modulating both of these processes. We therefore investigated the stages of LRP development affected by SNP. LRP were quantified 7 d after germination in plants treated with the solvent or with SNP concentrations of 20, 25 and 30 μM , which inhibit 50% primary root growth and induce LR formation (Fig. 2). Seedling roots were first cleared to enable LRP at early stages of development to be visualized and counted. LRP were classified according to their stage of development as reported by Malamy and Benfey (1997). We found that the stage distribution of LRP was affected by treatment with the NO donor. In particular, LRP stages I–V, which refer to developing LRP at early stages of development, were significantly increased in SNP-treated seedlings (Fig. 3A). The total number of LRP cm^{-1} was significantly increased in response to SNP treatments (Fig. 3B). We also analyzed LR initiation induced by an NO donor using the method described by Dubrovsky et al. (2009), which calculates LRP density in the primary root zone between the youngest LRP and the most distal emerged LR (LRP formation zone). Normalizing data with the length of 100 cortical cells, we determined the LR initiation index, which defines how many LRP are formed along a parent root portion. We found that although SNP inhibits root growth and cortical cell length, SNP treatments induce both LRP density and LR initiation index (Supplementary Fig. S3). These data suggest that NO can promote root branching in Arabidopsis by inducing de novo formation of LRP from pericycle cells.

NO inhibits primary root growth without compromising cell viability

To determine the effects of NO accumulation in response to SNP application on cell viability, cell division and differentiation processes in root tips, we analyzed the expression of the vital cell nuclei marker *AtHistH2B:YFP* (Boisnard-Lorig et al. 2001) by confocal laser scanning microscopy in seedlings stained with propidium iodide (PI), a fluorochrome that freely diffuses through dead or damaged cells (Kirik et al. 2001, Cruz-Ramírez et al. 2004). Treatments from 20 to 60 μM SNP were found to increase NO accumulation in root tips (Fig. 4A–D), inducing differentiation processes at the root tip region of primary roots, as revealed by root hair formation at the zone previously occupied by the meristem (Fig. 4C, D) and in LR (Fig. 4E–H). Visualization of *AtHistH2B:YFP* in the nuclei of cells in 7-day-old SNP-treated roots indicated that the cells in the primary root meristem were viable; in these cells, PI was unable to penetrate (Fig. 4I–L). These results suggest that the effects of NO on root development involve changes in cellular processes without affecting cell viability or integrity.

Endogenous NO depletion disrupt root architectural alterations induced by *N*-isobutyl decanamide in Arabidopsis

A pharmacological approach was employed to determinate the role of NO in *N*-isobutyl decanamide-induced RSA modulation. We tested the effects of *N*-isobutyl decanamide on root development and NO accumulation in the presence of the NO

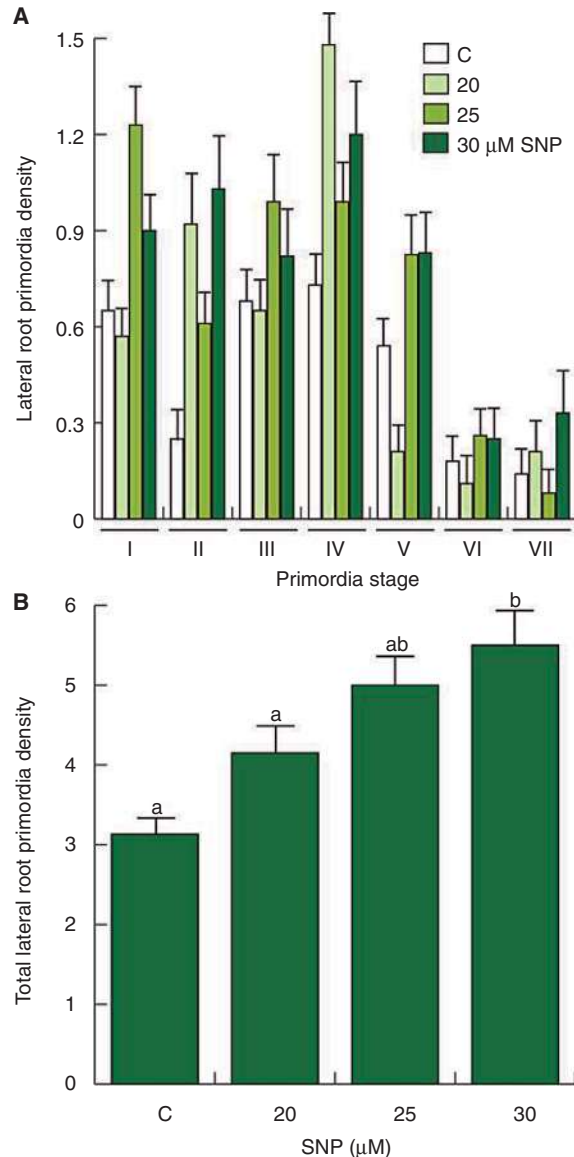


Fig. 3 Effects of NO on LRP development. Arabidopsis Col-0 seedlings were grown for 7 d on agar plates supplied with the solvent (Control, black bars) or with the NO donor sodium nitroprusside (SNP) at 20, 25 and 30 μM (color bars) (A). Data are presented for LRP developmental stages, and total LRP density (B). LRP stages were recorded according to Malamy and Benfey (1997). 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.

scavenger 2-(carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO). Arabidopsis WT (Col-0) seedlings were germinated and grown for 5 d on 0.2 \times MS medium and then transferred to the same fresh medium supplied with the solvent (control), with 100 μM cPTIO, 25 μM *N*-isobutyl decanamide or *N*-isobutyl decanamide plus 100 μM cPTIO.

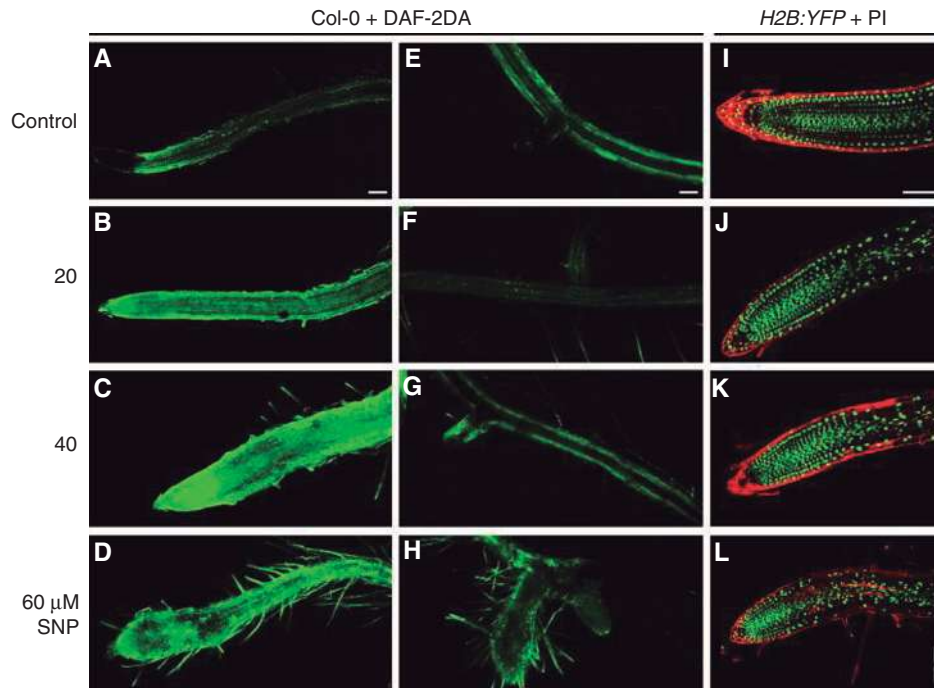


Fig. 4 Effects of SNP on NO accumulation, meristem cell viability and differentiation processes. WT (Col-0) seedlings were grown for 7 d on agar plates supplied with SNP at the indicated concentrations and then stained with DAF-2DA to reveal NO accumulation in primary root tips (A–D), and on emerged lateral roots (E–H). *AtHistH2B:YFP* seedlings were grown under the same conditions during 7 d and were stained with PI to determine cell structure and viability (I–L). A total of 10 seedlings were analyzed for each treatment condition and representative photographs were taken. The experiment was repeated three times with similar results.

RSA changes induced by the alkamide were quantified 3 d after transfer. It was found that seedlings transferred from 0.2× MS medium to solvent- or cPTIO-containing media showed similar primary root growth, while seedlings transferred to *N*-isobutyl decanamide showed decreased growth (Fig. 5A, B). cPTIO supply partially restored primary root growth to alkamide-treated seedlings (Fig. 5A, B), suggesting that NO is involved in primary root growth modulation by *N*-isobutyl decanamide.

As a method to determine the role of NO in alkamide-induced LR development, we quantified LRP specifically formed in response to alkamide treatment at the distal region of the primary root in a transfer assay. As shown in Fig. 5C, control or cPTIO-treated seedlings did not form any visible LRP in this root region. In contrast, the number of LRP dramatically increased in seedlings transferred to 25 μM *N*-isobutyl decanamide. This enhanced LRP formation and emergence of LRs was abolished when cPTIO was supplied in the medium together with the alkamide (Fig. 5C, D), suggesting that endogenous NO is involved in LRP formation triggered by *N*-isobutyl decanamide. Similar results were observed when we antagonized the effects of *N*-isobutyl decanamide with another NO scavenger, methylene blue (MB). MB was able to decrease NO accumulation in the root tip of *N*-isobutyl decanamide-treated seedlings, and partially reversed the primary root growth inhibition (Supplementary Fig. S4).

In addition to primary root growth, cell division and differentiation parameters were analyzed to determine the role of NO in cellular responses to *N*-isobutyl decanamide. We analyzed the expression of the cell cycle marker *CycB1:uidA* in transgenic seedlings transferred from 0.2× MS medium to medium containing 25 μM *N*-isobutyl decanamide with or without 100 μM cPTIO for a further 4 d growth period. The proliferative capacity of *N*-isobutyl decanamide-treated primary root meristems was restored by addition of cPTIO as revealed by the presence of *GUS* (β-glucuronidase)-expressing cells (Supplementary Fig. S5). As an indication of differentiation processes occurring at the root tip region, we also measured both the length from the quiescent center (QC) to the first root hair-containing cell at the root epidermis and the length from the QC to protoxylem cells. In seedlings that were transferred from 0.2× MS medium to medium containing *N*-isobutyl decanamide, dramatic reductions in the distance from the QC to the first root hair and from the QC to protoxylem cells were observed (Supplementary Fig. S5). These differentiation markers were modified in *N*-isobutyl decanamide-treated seedlings when cPTIO was supplied to the growth medium (Supplementary Fig. S5), indicating that cPTIO restores meristematic activity in roots of *N*-isobutyl decanamide-treated *Arabidopsis* seedlings, and that pharmacological reduction in NO levels decreases the effects of the alkamide on differentiation processes.

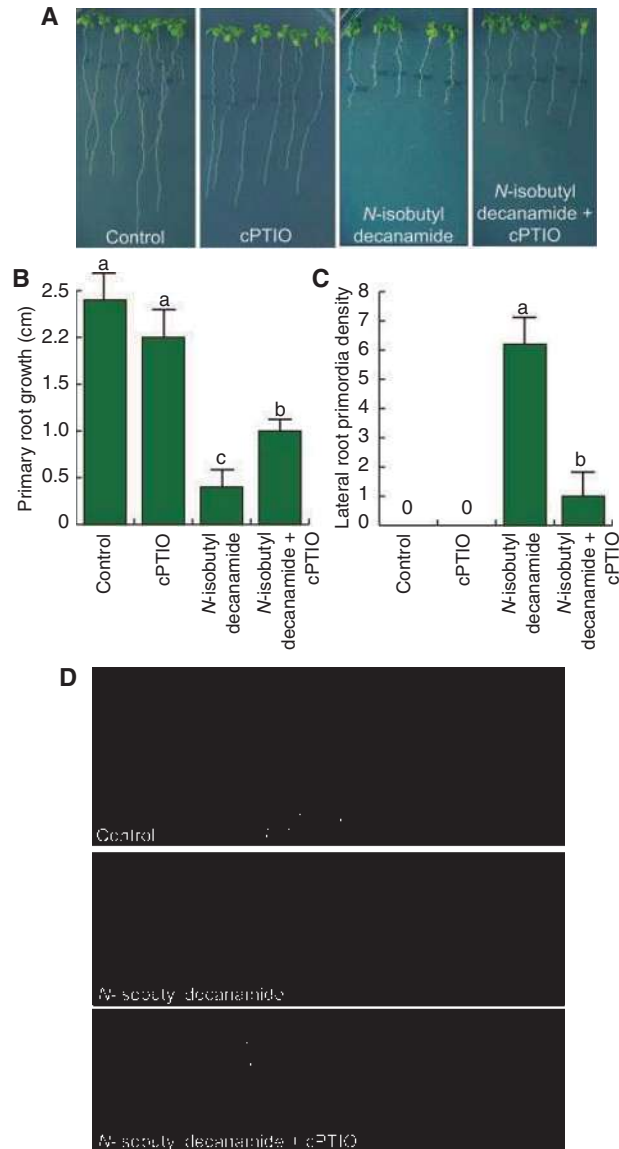


Fig. 5 Effects of endogenous NO depletion on *N*-isobutyl decanamide-modulated root system architecture. Five-day-old *Arabidopsis* (Col-0) seedlings were transferred for 3 d to plates supplied with the solvent (control), with 100 μ M of the NO scavenger cPTIO, with 25 μ M *N*-isobutyl decanamide or with *N*-isobutyl decanamide plus cPTIO. (A) Visible effects of treatments on primary root growth after transfer. (B) Primary root growth and (C) lateral root primordia density after transfer. (D) Stereoscopic magnification from the growing root tip after transfer; note the decrease in small emerged lateral roots when cPTIO was supplied with the alkamide. Photographs shown in A are representative of at least three plates analyzed ($n = 15$). The experiment was repeated twice with similar results.

Involvement of NO-related genes in *Arabidopsis* responses to *N*-isobutyl decanamide

To explore the contribution to NO biosynthesis of NR activity, i.e. *NIA1* and *NIA2* (Wilkinson and Crawford 1993), and *AtNOA1*

(Guo et al. 2003), in *Arabidopsis* responses to *N*-isobutyl decanamide, we compared the RSA of WT plants, the *Atnoa1* single mutant and *nia1 nia2* double mutant when grown under 30 μ M SNP or *N*-isobutyl decanamide concentrations. In these experiments, WT (Col-0), *Atnoa1* and *nia1 nia2* seeds were germinated and grown for 5 d on 0.2 \times MS agar plates, and then transferred onto 0.2 \times MS-containing plates supplied with the solvent (control), or the above indicated concentrations of SNP and *N*-isobutyl decanamide. Four days after transfer, primary root length and LR number were quantified. In medium lacking SNP and *N*-isobutyl decanamide, mutant lines *nia1 nia2* and *Atnoa1* sustained reduced primary root growth when compared with WT plants. This primary root growth defect could not be rescued by exogenous application of SNP or *N*-isobutyl decanamide (Fig. 6A). Moreover, we found that both mutant lines sustained similar sensitivity to SNP and the alkamide in terms of primary root growth inhibition (Fig. 6A), indicating that primary root growth inhibition caused by SNP and *N*-isobutyl decanamide might be independent of NO production by NRs and *AtNOA1*. Interestingly, the two NO-related mutants showed reduced LR responses to SNP or *N*-isobutyl decanamide (Fig. 6B, C), indicating that *NIA1*, *NIA2* and *AtNOA1* could participate in alkamide-modulated LR induction.

The alkamide-resistant mutant *drr1* displays reduced sensitivity to NO donors

To investigate a potential interaction between alkamide and NO signaling at the level of the alkamide-related *DRR1* locus, we evaluated biomass production and RSA responses of WT (*Ws* ecotype) and *drr1* seedlings to exogenous application of SNP. Developmental alterations induced by SNP treatment were accompanied by a dose-dependent reduction in both shoot and root fresh weight in WT seedlings, while *drr1* seedlings were less affected by SNP (Supplementary Fig. S6). A 60 μ M SNP treatment dramatically inhibited leaf formation in WT seedlings, but showed no or little inhibition in the mutants (Supplementary Fig. S6).

The SNP dose–response of WT and *drr1* seedlings in RSA modification was also determined. Both WT and *drr1* primary root growth was inhibited by increased concentrations of SNP. However, *drr1* seedlings showed a significantly reduced inhibition at most SNP concentrations tested when compared with WT seedlings (Fig. 7A). SNP concentrations from 30 to 50 μ M increased the number of emerged mature LRs in WT seedlings by around 60–80% (Fig. 7B, C). As previously reported by Morquecho-Contreras et al. (2010), in solvent-treated medium, LR formation in *drr1* was significantly reduced compared with WT seedlings. Interestingly, *drr1* mutants failed to produce increased numbers of LRs when exposed to stimulatory concentrations of SNP (Fig. 7B, C).

To understand further the role played by *DRR1* in LR formation in response to SNP, we determined LRP originating from the primary root at 7 d after germination in plants grown in 0.2 \times MS agar medium supplied with the solvent only or with 30 μ M SNP. In solvent-treated WT plants, LRP induction at an

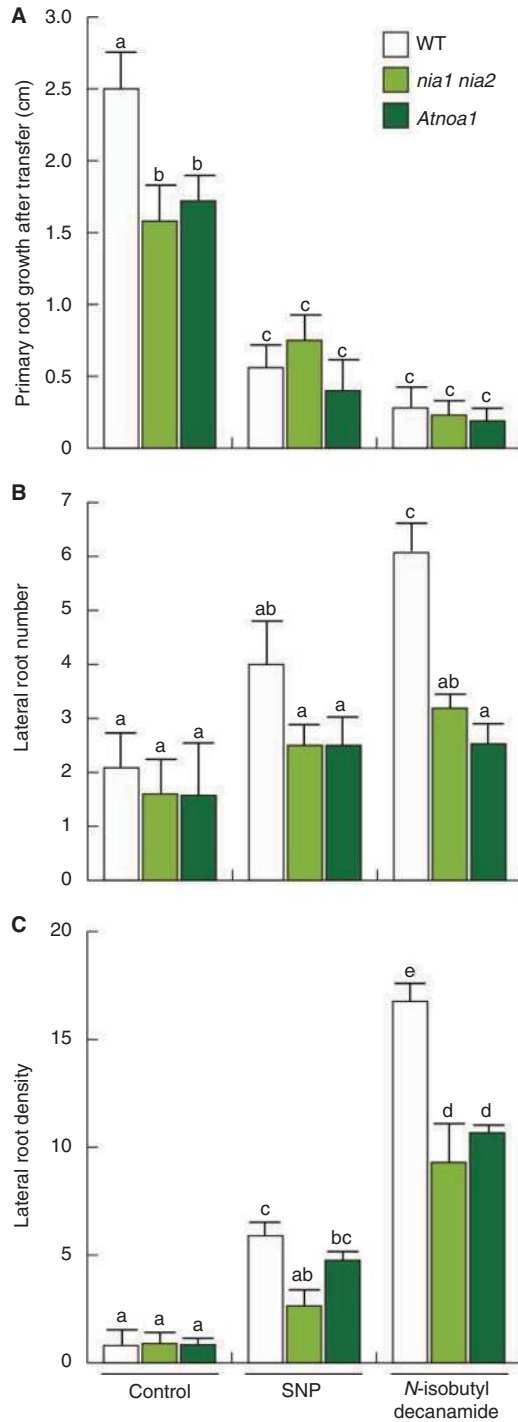


Fig. 6 Effects of *N*-isobutyl decanamide on root system architecture in Arabidopsis NO-related mutants. Wild-type (*Col-0*), *nia1 nia2* and *Atnoa1* seedlings were germinated and grown for 5 d on 0.2× MS agar medium and transferred to plates supplied with the solvent (control), with 30 μM of either the NO donor SNP or *N*-isobutyl decanamide. Four days after transfer, primary root growth (A) and emerged lateral roots (B and C) were determined for a total of 15 seedlings. Different letters are used to indicate means that differ significantly ($P < 0.05$). The experiment was repeated twice with similar results.

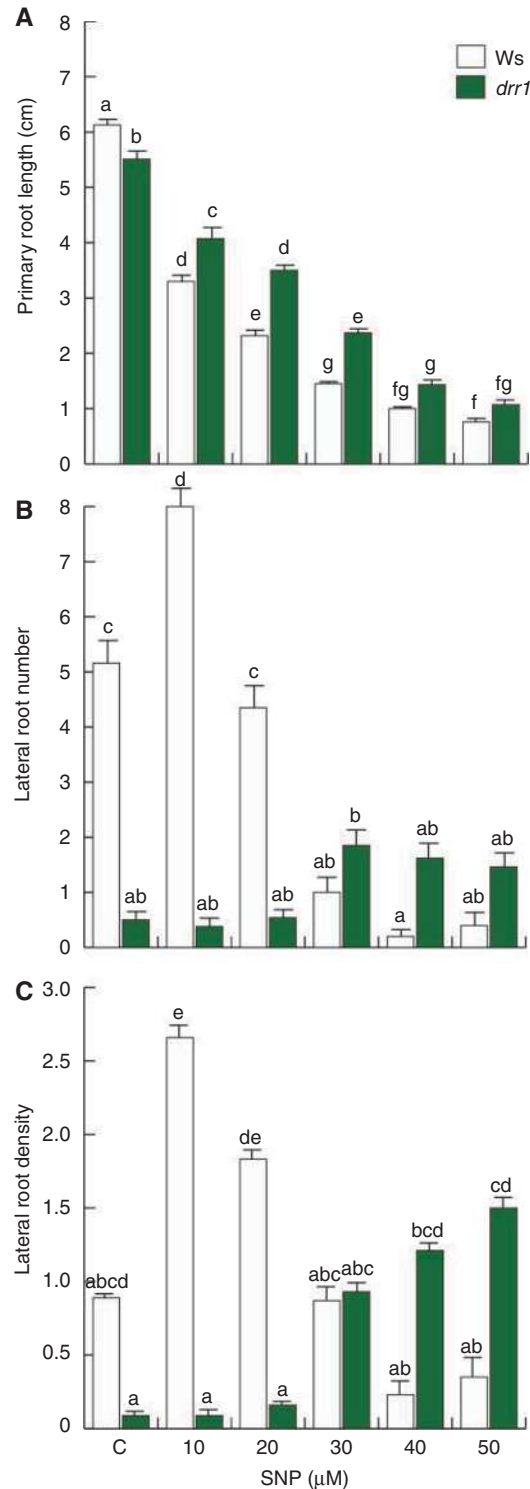


Fig. 7 Effects of SNP on root system architecture of WT and *drr1* seedlings. (A) Primary root length. (B) Number of emerged lateral roots per plant. (C) Lateral root density expressed as the number of lateral roots per cm. Data were recorded at 10 d after germination. Values shown are the mean ± SD ($n = 20$). Different letters represent statistically different means ($P < 0.05$). The experiment was repeated three times with similar results.

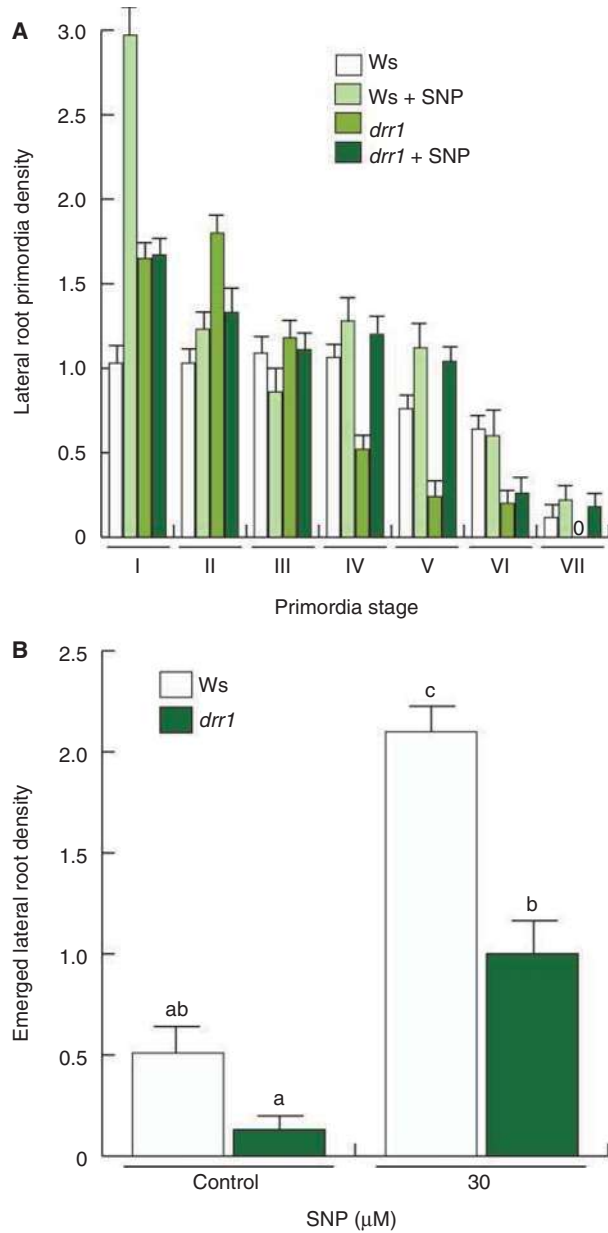


Fig. 8 Effects of SNP on WT and *drr1* lateral root development. (A) LRP stage distribution in 7-day-old primary roots grown on medium supplied with the solvent only or with 30 μM SNP. (B) Emerged lateral root density in the same experiment. WT and *drr1* seedlings were cleared and the number and stage of LRP recorded according to Malamy and Benfey (1997). Values shown are the mean ± SD ($n = 15$). Different letters represent statistically different means ($P < 0.05$). This analysis was repeated twice with similar results.

early developmental stage (stage 1) was increased by 300% by SNP. Interestingly, SNP did not increase LRP density at early developmental stages in *drr1* plants (Fig. 8A). Although SNP treatment significantly increased total emerged LR density in *drr1* mutants, the induction never reached the level observed in

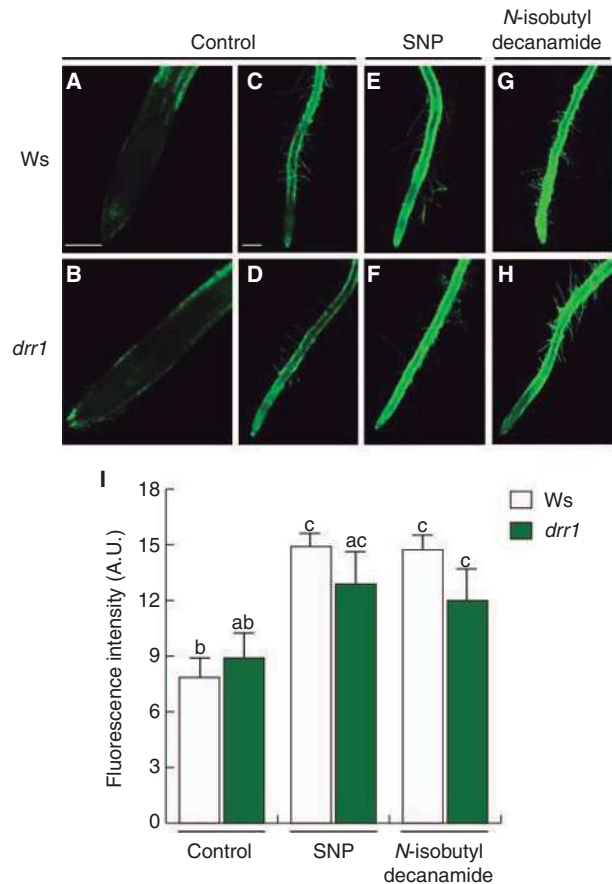


Fig. 9 NO endogenous levels in WT (*Ws* ecotype) and *drr1*. Seven-day-old seedlings were stained with DAF-2DA after growth in solvent (control, A–D), 30 μM SNP (E and F) or 30 μM *N*-isobutyl decanamide (G and H). Representative images were captured by laser confocal microscopy. (I) DAF-2T fluorescence signals from roots ($n = 10$) were quantified using the ImageJ program. The graph is expressed in arbitrary units.

WT seedlings (Fig. 8B), indicating that *drr1* was less sensitive to de novo formation of LRP induced by an NO donor. A similar effect was observed when LRP and emerged LRs mm⁻¹ were calculated as described by Dubrovsky et al. (2009) (Supplementary Fig. S7). Furthermore, our data show that SNP modifies RSA probably by inducing more pericycle cells to form stage I LRP and by accelerating the emergence of LRP from the primary root to form mature LRs. To determine whether reduced alkamide and NO responses in the *drr1* could be caused by defective accumulation of NO or NO perception, the level of NO in *Arabidopsis* WT and *drr1* seedlings was determined by DAF-2DA and confocal microscopy. Fig. 9 shows that treatment with 30 μM SNP or *N*-isobutyl decanamide similarly increased fluorescence in primary roots, indicative of NO accumulation. Taken together, our data show that mutations in *drr1* interfere with earlier stages of LRP formation in response to NO, probably affecting a signaling component rather than blocking NO accumulation in the plant.

Alkamide, JA, and NO act downstream or independently of auxin signaling to promote LR formation

The plant hormone JA plays an important role in LR development (Sun et al. 2009). While JA application led to increased LR numbers in WT seedlings, it failed to activate LR formation in *drr1*, suggesting an alkamide–JA cross-talk in LR development (Morquecho-Contreras et al. 2010). Auxin-induced LR formation is another well-studied, NO-mediated process (Correa-Aragunde et al. 2004, Correa-Aragunde et al. 2006). To test whether alkamides, JA and NO could modulate auxin-inducible gene expression and in this way stimulate LR formation, we compared the effect of these signals with that of IAA on LRP formation in Arabidopsis transgenic plants expressing the auxin-responsive markers *DR5:uidA* (Ulmasov et al. 1997) and *BA3:uidA* (Oono et al. 1998). We found that 0.125 μM IAA or 30 μM JA, *N*-isobutyl decanamide or SNP similarly inhibited primary root growth in both *DR5:uidA* and *BA3:uidA* seedlings (Fig. 10A, and data not shown). LRP stage determination showed that all four compounds IAA, *N*-isobutyl decanamide, JA and SNP were able to induce LRP formation in a similar way (Fig. 10B). Interestingly, while a 0.125 μM IAA treatment clearly induced auxin-responsive gene expression, 30 μM JA, *N*-isobutyl decanamide or SNP failed to elicit *DR5:uidA* and *BA3:uidA* (Fig. 10C). These data suggest that alkamides and interacting partners JA and NO act downstream or independently of auxin-responsive gene expression to promote LRP formation.

Discussion

Plants display considerable root developmental plasticity in response to biotic and abiotic factors. This developmental plasticity is an integral part of adaptive strategies for overcoming their immobility and allows plants to place their resource-capturing organs in close contact with vital resources such as nutrients and water, which vary significantly in both quantity and spatial distribution in natural environments. Root length, LR density and root hair formation become important for nutrient and water transport to the plant (López-Bucio et al. 2003, Malamy 2005). Although IAA is considered the major plant growth-regulating substance underlying RSA adjustment, the discovery of novel signal molecules such as alkamides, JA and NO, which are involved in the intricate network that triggers RSA, has been a recent goal in plant biology. Post-embryonic root development relies on the activity of the primary root meristem, established during embryogenesis, and the continued production of new meristems to form LRs. IAA promotes root branching through the dedifferentiation of pericycle cells to form LR meristems. Although a variety of components of auxin transport and signal transduction have been identified, the molecular mechanisms underlying the initiation of new LR meristems in response to other promoting molecules such as alkamides, NAEs, AHLs and their interacting partners is poorly

understood (Nibau et al. 2008, Ortíz-Castro et al. 2008, Sun et al. 2009, Morquecho-Contreras et al. 2010).

In this work we investigated the role of NO in RSA modulation by *N*-isobutyl decanamide in the model plant *A. thaliana*. Much of the work with NO signaling has involved the pharmacological application of NO donors such as SNP to emulate NO production, NO scavengers such as 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide (PTIO) or cPTIO to remove the signal (Goldstein et al. 2003), and detection methods that employ dyes such as DAF-2DA, which fluoresces when it binds to the N_2O_3 formed by the reaction of NO with NO_2 (Wilson et al. 2008). By using these different strategies, the roles of NO in plants have been elucidated in numerous physiological processes throughout the entire plant life cycle. We used the cell-permeable diacetate DAF-2DA as an NO fluorescence indicator. Upon NO production, DAF-2 is nitrosated to give the highly fluorescing and relatively stable DAF-2T. We found that *N*-isobutyl decanamide treatments from 12.5 to 50 μM induced an intense DAF-2T fluorescence in root tips, which was related to primary root growth inhibition and increased LR formation (Fig. 1). Two NO donors, SNP and SNAP, were found to mimic the effects of *N*-isobutyl decanamide on RSA (Figs. 2, 3, and Supplementary Figs S2, S3). In our assays, SNP was more active than SNAP at inhibiting primary root growth; this effect could be explained because SNP produces other volatiles such as HCN. However, HCN ions inhibited both primary root growth and LR development (Supplementary Fig. S8), indicating that at least the stimulation of LR development by SNP occurs independently of HCN. These data not only confirm the signaling role played by NO on LR development as previously reported (Pagnussat et al. 2002, Correa-Aragunde et al. 2004, Correa-Aragunde et al. 2006), but also suggest that NO is involved in root responses to alkamides by acting as a second messenger, as supported by the findings that SNP treatment indeed increases DAF-2T fluorescence (Fig. 4) and because depletion of endogenous NO resulted in decreased *N*-isobutyl decanamide responses in terms of LR formation (Fig. 5, and Supplementary Figs S4, S5).

To date, a limited number of Arabidopsis NO-related mutants have been reported, including *Atnoa1*, which is defective in a cGTPase, and *nia1 nia2*, which is defective in NRs. In medium lacking SNP and *N*-isobutyl decanamide, both mutant lines *nia1 nia2* and *Atnoa1* sustained reduced primary root growth when compared with WT plants. This primary root growth defect could not be rescued by exogenous application of SNP or *N*-isobutyl decanamide (Fig. 6A). Moreover, we found that both mutant lines sustained similar sensitivity to SNP and the alkamide in terms of primary root growth inhibition (Fig. 6A), indicating that primary growth inhibition caused by SNP and *N*-isobutyl decanamide occurs independently of NO production by NIA1, NIA2 and AtNOA1. Interestingly, *Atnoa1* and *nia1 nia2* mutants showed reduced LR formation in response to *N*-isobutyl decanamide treatments when compared with WT seedlings, suggesting that these genes

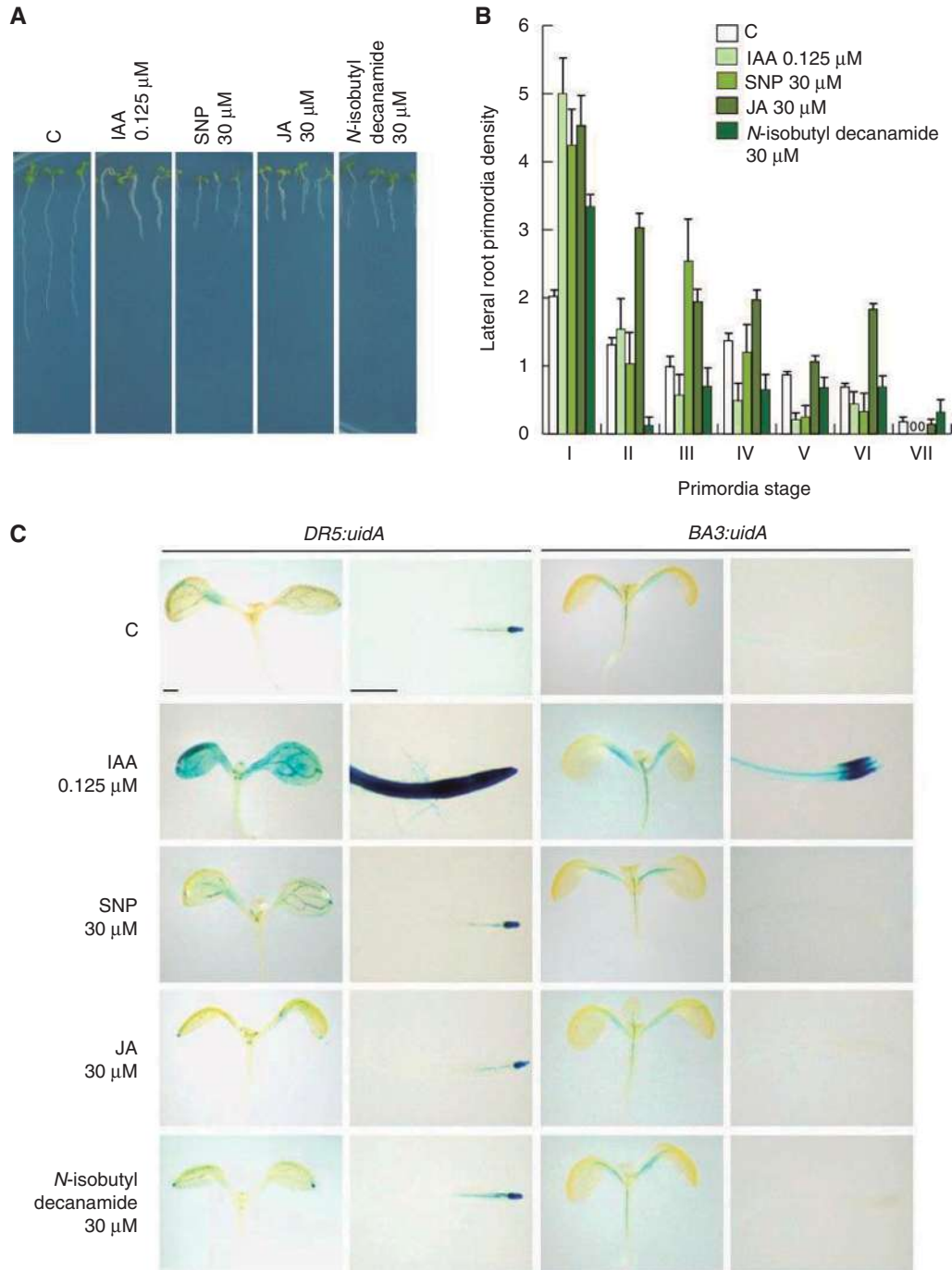


Fig. 10 Comparative effect of IAA, SNP, N-isobutyl decanamide and JA on RSA and auxin-inducible gene expression. (A) Seven-day old Col-0 Arabidopsis seedlings grown on agar plates with the indicated concentrations of compounds. (B) Effect of compounds on LRP stages. (C) Twelve hour GUS staining of *DR5:uidA* and *BA3:uidA* Arabidopsis seedlings grown for 6 d on agar plates containing 0.2 \times MS medium and then transferred for 24 h to liquid 0.2 \times MS medium supplied with 0.125 μ M IAA or 30 μ M SNP, JA and N-isobutyl decanamide. Values shown in B are the mean \pm SD ($n = 15$). Photographs in C are representative individuals of at least 15 stained seedlings. The experiment was repeated twice with similar results.

play a role in pericycle cell activation in response to the alkamide (Fig. 6B, C). These results suggest that different NO sources are involved in promoting LR development with potentially redundant functions. It has been recently suggested

that the decreased NO production in the *Atnoa1* mutant might result from pleiotropic effects of defective plastids (Flores-Pérez et al. 2008, Gas et al. 2009) rather than by a direct role on NO synthesis. Our results are consistent with this

hypothesis by showing that neither primary root growth nor LR development can reach normal levels after SNP or alkamide induction in *Atnoa1*. It is therefore possible that multiple NO sources are involved in producing NO in response to alkamide stimuli, which would explain the effects of the compounds inducing callus formation on leaves (López-Bucio et al. 2007), an effect reminiscent of altered cytokinin levels, and their auxin-like effects involved in RSA modulation.

Our previous research provided genetic evidence that alkamide and AHL perception are under genetic control in Arabidopsis, which was achieved by the isolation and characterization of the *N*-isobutyl decanamide-resistant mutant *drr1* (Morquecho-Contreras et al. 2010). Under normal growth conditions *drr1* plants show normal primary root growth but reduced LR formation, indicating that small fatty acid amide signaling is important for lateral root development. IAA and 1-naphthaleneacetic acid treatment similarly induced lateral root formation in WT and *drr1* plants, indicating that the mutant is not inherently defective on LRP initiation, but rather shows retardation in the establishment and emergence of LR meristems. Interestingly, our current analysis shows that *drr1* is less sensitive to SNP in terms of primary root growth inhibition and LR formation than WT plants (Fig. 7, and Supplementary Fig. S7). Moreover, the mutant was unable to activate de novo formation of LRP in response to SNP, indicating that NO is a mediator of alkamides in pericycle cell induction (Fig. 8). DAF-2DA fluorescence determination in WT and *drr1* seedlings in response to SNP or *N*-isobutyl decanamide treatments showed strong fluorescence in both WT and *drr1* primary roots (Fig. 9). These results indicate that *drr1* is not inherently defective in NO accumulation induced by the alkamide. It is tempting to speculate that *DRR1* plays a signaling role mediating the effects of NO on LR formation.

The effect of *N*-isobutyl decanamide treatment on Arabidopsis RSA is reminiscent of plants treated with auxins. Pagnussat et al. (2002) and Correa-Aragunde et al. (2004) provided evidence of the involvement of NO during auxin-induced lateral and adventitious root formation in plants. However, our previous results showed that auxins might not be involved in the root architectural responses of Arabidopsis to alkamides. This hypothesis was mainly based on two lines of evidence: expression studies of the auxin-inducible marker *DR5:uidA* and the WT induction of lateral and adventitious roots in the auxin-related mutants *axr2-1*, *aux1-7*, *eir1-1* and *axr4-1* when grown in a stimulating concentration of alkamides (Ramírez-Chávez et al. 2004, Campos-Cuevas et al. 2008). Our present results show that: (i) NO inhibits primary root growth and stimulates LR development in Arabidopsis seedlings; (ii) *N*-isobutyl decanamide promotion of LR development can be prevented by scavenging NO; (iii) NO-related mutants *Atnoa1* and *nia1 nia2* are compromised in LR responses to *N*-isobutyl decanamide; (iv) *drr1* mutants are less sensitive to SNP in primary root growth and LR development; and (v) SNP application did not induce *DR5:uidA* and *BA3:uidA* gene expression. Since previous research suggested that

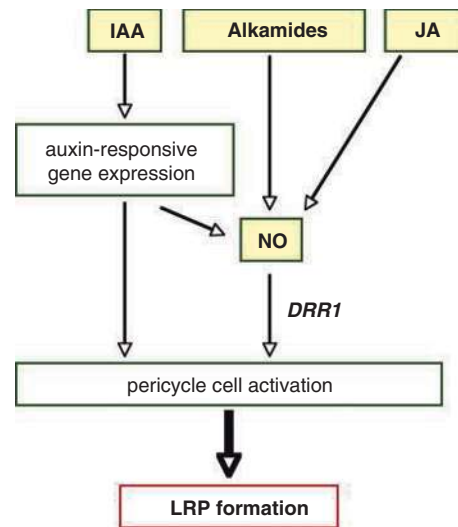


Fig. 11 Role of NO in lateral root formation in responses to different plant signals. IAA activates auxin-responsive gene expression (i.e. *DR5:uidA*, *BA3:uidA*) in pericycle cells to promote LRP initiation. The NO donor SNP, *N*-isobutyl decanamide and JA failed to induce auxin-responsive gene markers (Fig. 10); therefore, NO probably acts downstream of auxin signaling to promote lateral root formation. *DRR1* may act as a messenger in alkamide- and JA-induced pericycle cell activation modulating NO root responses.

alkamide and JA signaling interact at the level of the *DRR1* locus to modulate LRP formation in plants (Morquecho-Contreras et al. 2010), all this novel evidence provides compelling support for a role for NO as an integrator of different signaling pathways, which promote LR development, including auxins, alkamides and JA (Fig. 11). Our model supports the hypothesis that NO acts downstream of auxin signaling to modulate cell cycle gene expression in pericycle cells either by acting as a second messenger modulating transcription of cell cycle genes or by direct binding to regulatory and/or structural proteins responsible for cell cycle transition, affecting their function by nitration or nitrosylation. We cannot exclude the possibility that NO may also play a role as an integrator of morphogenetic responses to alkamides in green tissues or during plant senescence, since the *drr1* mutants show a dramatically extended life span (Morquecho-Contreras et al. 2010). We anticipate that cell tissue specificity and the amplitude of the NO signal induced by a different plant growth regulator may determine the particular development outcome involved in determination of plant architecture.

Materials and Methods

Plant material and growth conditions

Arabidopsis wild-type and transgenic seedlings expressing the histone *H2B:YFP* (Boisnard-Lorig et al. 2001), both of the ecotype Columbia (Col-0), were used. For *drr1* mutant analysis, Wassilewskija (Ws) ecotype seeds were employed as WT control.

Seeds were surface sterilized with 95% (v/v) ethanol for 5 min and 20% (v/v) bleach for 7 min, and stratified for 3 d at 4°C. Later, they were germinated and grown on 0.8% agar plates supplied with 0.2× MS salts. Plates were placed vertically at an angle of 65° to allow root growth along the agar surface and to allow unimpeded growth of the hypocotyl into the air. For plant growth, we used a plant growth cabinet (Percival Scientific AR95L), with a photoperiod of 16 h light, 8 h darkness, light intensity of 300 μmol/m²/s⁻¹ and temperature of 22°C.

For transfer experiments, WT Col-0, transgenic *CycB1:uidA* (Colón-Carmona et al. 1999), *nia1 nia2* double mutant (Wilkinson and Crawford 1993) and *Atnoa1* knockout (Guo et al. 2003) seeds were first sterilized and germinated on 0.2× MS medium as described above, and, after 5 d of further growth, seedlings were transferred to control [dimethylsulfoxide (DMSO)- or ethanol-containing medium], or to *N*-isobutyl decanamide-, cPTIO- or SNP-containing 0.2× MS medium for a 4 d additional period prior of analysis.

Chemicals

N-Isobutyl decanamide was obtained by catalytic reduction of affinin, the most abundant alkamide present in *Heliopsis longipes* (Gray) Blake (Asteraceae) roots as described before (Ramírez-Chávez et al. 2004). The NO donors SNP and SNAP, and NO scavengers MB and cPTIO were purchased from Sigma. All reagents were dissolved in DMSO and used at the indicated concentrations. In control seedlings, we added the solvents in equal amounts as present in the greatest concentration of compound tested.

Analysis of growth

Arabidopsis root system and primary root meristem integrity were analyzed with a stereoscopic microscope (Leica, MZ6). All LRs emerged from the primary root and observed with the ×3 objective were taken into account for LR number data. Images were captured with a SAMSUNG SCC 131-A digital color camera adapted to the microscope. Primary root length was determined for each root using a ruler. LR number was determined by counting the LRs per seedling, and LR density was determined by dividing the LR number value by the primary length values for each analyzed seedling. For transference assays, the LRs were counted from the tip to the marked site of primary root length when the transfer was made. Root differentiation patterns were analyzed by measuring the length from the QC to the first root hair, to protoxylem initiation and to the first LR in semi-permanent preparations of cleared seedlings using a compound microscope (Leica CME) at ×20 or ×40 magnifications. The same preparations were used for LRP analysis. For all presented data, the mean ± SD was calculated from at least 30 seedlings. For all experiments with WT and mutant lines, the overall data were statistically analyzed using the SPSS 10 program. Univariate and multivariate analyses with a Tukey's post-hoc test were used for testing differences in growth and root developmental responses. Different letters are used to indicate means that differ significantly ($P < 0.05$).

Determination of developmental stages of LRP

LRP 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 formed LRP are 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: LRP with four cell layers. Stage V: the LRP are midway through the parent cortex. Stage VI: the LRP have passed through the parent cortex layer and have penetrated the epidermis. They begin to resemble the mature root tip, and, at stage VII, the LRP appear to be just about to emerge from the parent root.

Confocal microscopy

NO detection. NO was monitored by incubating Arabidopsis seedlings with 10 μM of the fluorescent probe DAF-2DA (Kojima et al. 1998) in 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4). Treated seedlings were incubated for 2 h in the dark, and washed three times for 20 min with fresh buffer. Fluorescence signals were detected using a confocal laser scanning microscope (model BX50; Olympus), 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. Fluorescence signals were quantified by counting pixel number in the green channel by employing ImageJ software.

PI staining and yellow fluorescent protein (YFP) detection. For fluorescent staining with PI, recently collected plants with intact root systems were transferred to a solution of 10 mg ml⁻¹ PI for 3 min. Seedlings were rinsed in water and mounted in 50% glycerol on microscope slides. The same sample was recorded separately at wavelengths specific to both PI fluorescence with an 568 nm excitation line and a emission window of 585–610 nm, and YFP emission with a 505–550 nm bandpass emission filter (488 nm excitation line), after which the two images were merged to produce the final image.

Histochemical analysis

For histochemical analysis of GUS activity, transgenic *CycB1:uidA DR5:uidA* and *BA3:uidA* Arabidopsis seedlings were immersed in GUS reaction buffer (0.5 mg ml⁻¹ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide in 100 mM sodium phosphate, pH 7) and incubated for 14 h at 37°C. The stained seedlings were cleared by the method of Malamy and Benfey (1997). For each treatment at least 10 transgenic plants were analyzed. A representative plant was chosen for each treatment and photographed using the Leica CME compound microscope.

Supplementary data

Supplementary data are available at PCP online.

Funding

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología [CONACYT, México, grants Nos. 43978 and 60999]; the Consejo de la Investigación Científica [UMSNH, México, grant No. CIC 2.26].

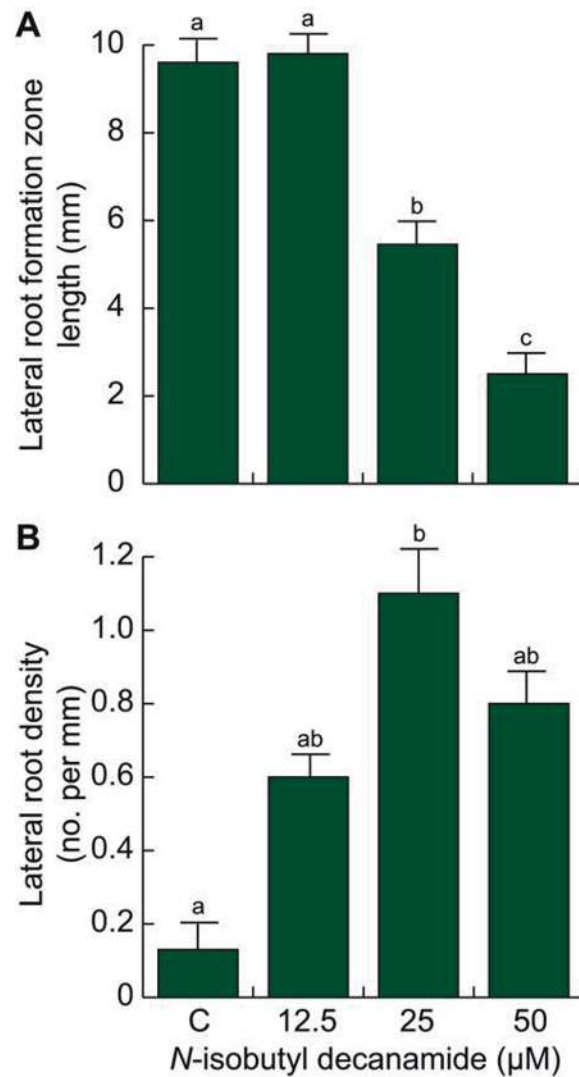
Acknowledgments

We thank Drs. Steven Neill, Nigel Crawford, Peter Doerner and Frédérick Berger for kindly providing us with seeds of transgenic and mutant lines. Alejandra Chacón López and Nydia Hernández Ríos are gratefully acknowledged for technical support with confocal microscopy.

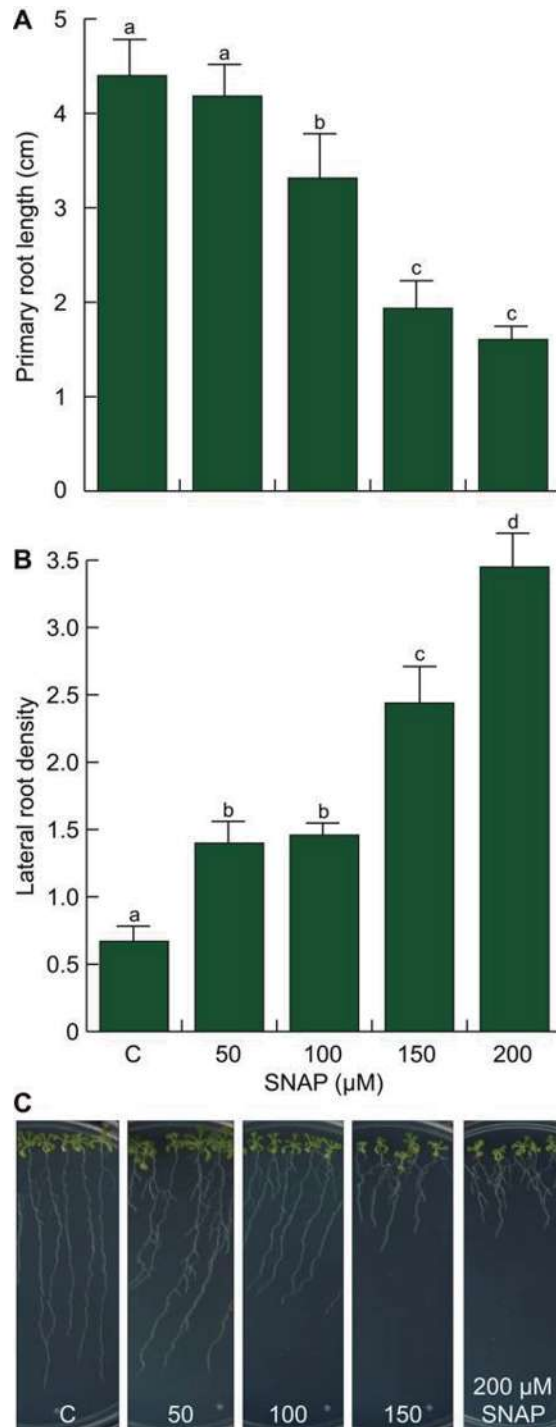
References

- Beligni, M.V. and Lamattina, L. (2001) Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant Cell Environ.* 24: 267–278.
- Bethke, P.C., Badger, M.R. and Jones, R.L. (2004) Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell* 16: 332–341.
- Blancaflor, E.B., Hou, G. and Chapman, K.D. (2003) Elevated levels of *N*-lauroyl ethanolamine, an endogenous constituent of desiccated seeds, disrupt normal root development in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Planta* 217: 206–217.
- Boisnard-Lorig, C., Colon-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.
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J.T., Weir, I.S. and Neill, S.J. (2006) ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant J.* 45: 113–122.
- 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 alkamides on adventitious root formation and nitric oxide accumulation. *Plant Sci.* 174: 165–173.
- 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.
- Correa-Aragunde, N., Graziano, M., Chevalier, C. and Lamattina, L. (2006) Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. *J. Exp. Bot.* 57: 581–588.
- Correa-Aragunde, N., Graziano, M. and Lamattina, L. (2004) Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta* 218: 900–905.
- Crawford, N.M., Galli, M., Tischner, R., Heimer, Y.M., Okamoto, M. and Mack, A. (2006) Response to Zejmotel et al.: plant nitric oxide synthase: back to square one. *Trends Plant Sci.* 11: 526–527.
- Cruz-Ramírez, A., López-Bucio, J., Ramírez-Pimentel, J.G., Zurita-Silva, A., Sánchez-Calderón, L., Ramírez-Chávez, E., et al. (2004) The *xip1* mutant of *Arabidopsis* reveals a critical role for phospholipid metabolism in root system development and epidermal cell integrity. *Plant Cell* 16: 2020–2034.
- Dean, J.V. and Harper, J.E. (1986) Nitric oxide and nitrous oxide production by soybean and winged bean during the in vivo nitrate reductase assay. *Plant Physiol.* 82: 718–723.
- Desikan, R., Griffiths, R., Hancock, J. and Neill, S. (2002) A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99: 16314–16318.
- Dubrovsky, J.G., Soukup, A., Napsucially-Mendivil, S., Jeknić, Z. and Ivanchenko, M.G. (2009) The lateral root initiation index: an integrative measure of primordium formation. *Ann. Bot.* 103: 807–817.
- Flores-Pérez, U., Sauret-Gueto, S., Gas, E., Jarvis, P. and Rodríguez-Concepción, M. (2008) A mutant impaired in the production of plastome-encoded proteins uncovers a mechanism for the homeostasis of isoprenoid biosynthetic enzymes in *Arabidopsis* plastids. *Plant Cell* 20: 1303–1315.
- Gas, E., Flores-Pérez, U., Sauret-Gueto, S. and Rodríguez-Concepción, M. (2009) Hunting for plant nitric oxide synthase provides new evidence of a central role for plastids in nitric oxide metabolism. *Plant Cell* 21: 18–23.
- Goldstein, S., Russo, A. and Samuni, A. (2003) Reactions of PTIO and carboxy-PTIO with NO, NO₂ and O₂. *J. Biol. Chem.* 278: 50949–50955.
- Grün, S., Lindermayr, C., Sell, S. and Durner, J. (2006) Nitric oxide and gene regulation in plants. *J. Exp. Bot.* 57: 507–516.
- Guo, F.-Q., Okamoto, M. and Crawford, N.M. (2003) Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signalling. *Science* 302: 100–103.
- Huang, X., Stettmaier, K., Michel, C., Hutzler, P., Mueller, M.J. and Durner, J. (2004) Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 218: 938–946.
- Kirik, V., Bouyer, D., Schobinger, V., Bechtold, N., Herzog, M., Beneville, J.M., et al. (2001) *CPR5* is involved in cell proliferation and cell death control and encodes a novel transmembrane protein. *Curr. Biol.* 11: 1891–1895.
- Kojima, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Kirino, Y., Nahoshi, H., Hirata, Y., et al. (1998) Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal. Chem.* 70: 2446–2453.
- Laurerio-Rosario, S., Silva, A. and Parente, J. (1996) Alkamides from *Cissampelos glaberrima*. *Planta Med.* 62: 376–377.
- López-Bucio, J., Acevedo-Hernández, G., Ramírez-Chávez, E., Molina-Torres, J. and Herrera-Estrella, L. (2006) Novel signals for plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 523–529.
- 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., Millán-Godínez, M., Méndez-Bravo, A., Morquecho-Contreras, A., Ramírez-Chávez, E., Molina-Torres, J., et al. (2007) Cytokinin receptors are involved in alkamide regulation of root and shoot development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 145: 1703–1713.
- Malamy, J. (2005) Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell Environ.* 28: 67–77.
- Malamy, J.E. and Benfey, P.N. (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124: 33–44.
- Moreau, M., Lee, G.L., Wang, Y., Crane, B.R. and Klessig, D.F. (2008) *AtNOS1/AtNOA1* is a functional *Arabidopsis thaliana* cGTPase and not a nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 283: 32957–32967.

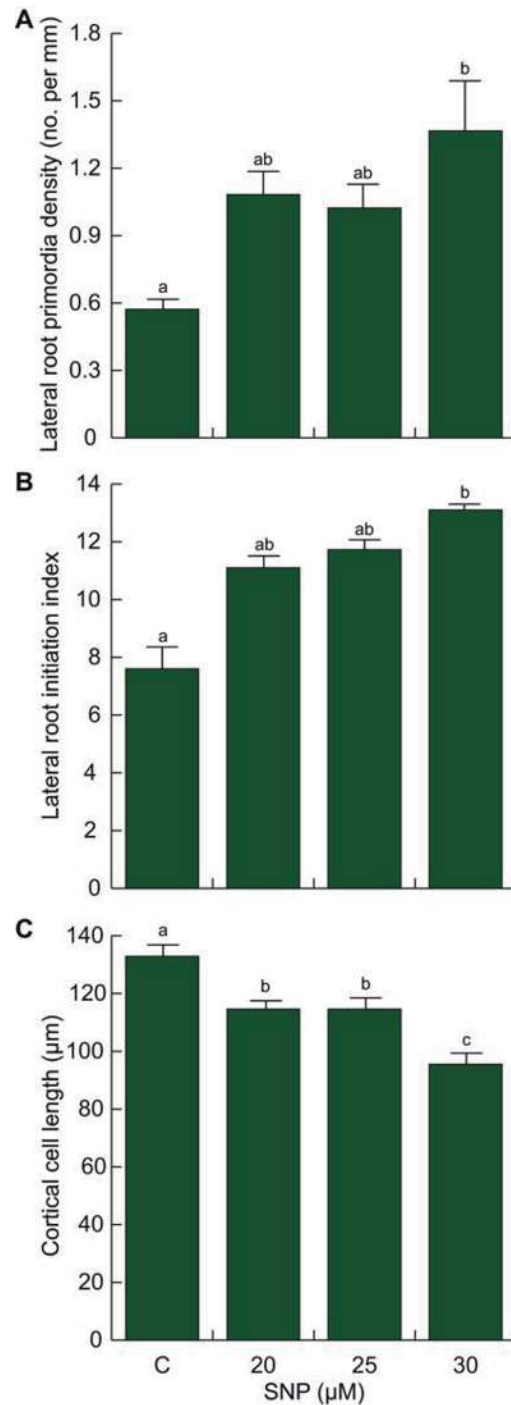
- Morquecho-Contreras, A., Méndez-Bravo, A., Pelagio-Flores, R., Raya-González, J., Ortíz-Castro, R. and López-Bucio, J. (2010) Characterization of *dr1*, an alkamide resistant mutant of *Arabidopsis* reveals an important role for small lipid amides in lateral root development and plant senescence. *Plant Physiol.* 152: 1659–1673.
- Neill, S.J., Desikan, R. and Hancock, J.T. (2003) Nitric oxide signaling in plants. *New Phytol.* 159: 11–35.
- Nibau, C., Gibbs, D.J. and Coates, J.C. (2008) Branching out in the directions: the control of root architecture by lateral root formation. *New Phytol.* 179: 595–614.
- 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.
- Ortíz-Castro, R., Martínez-Trujillo, M. and 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.
- Pagnussat, G.C., Simontacchi, M., Puntarulo, S. and Lamattina, L. (2002) Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol.* 129: 954–956.
- Planchet, E. and Kaiser, W.M. (2006) Nitric oxide production in plants. *Plant Signal. Behav.* 1: 46–51.
- Ramírez-Chávez, E., López-Bucio, J., Herrera-Estrella, L. and Molina-Torres, J. (2004) Alkamides isolated from plants promote growth and alter root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134: 1058–1068.
- Ríos-Chávez, P., Ramírez-Chávez, E., Armenta-Salinas, C. and Molina-Torres, J. (2003) *Acmella radicans* var. *radicans*: in vitro culture establishment and alkamide content. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 39: 37–41.
- Rockel, P., Strube, F., Wildt, J. and Kaiser, W.M. (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *J. Exp. Bot.* 53: 103–110.
- Sun, J., Xu, Y., Ye, S., Jiang, H., Chen, Q., Liu, F., 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.
- Tun, N.N., Livaja, M., Kieber, J.J. and Scherer, G.F.E. (2008) Zeatin-induced nitric oxide (NO) biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* mutants of NO biosynthesis and of two-component signaling genes. *New Phytol.* 178: 515–531.
- 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.
- Wang, Y., Ries, A., Yang, A. and Crawford, N. (2010) The *Arabidopsis* prohibitin gene *PHB3* functions in nitric oxide-mediated responses and in hydrogen peroxide-induced nitric oxide accumulation. *Plant Cell* 22: 249–259.
- Wilkinson, J.Q. and Crawford, N.M. (1993) Identification and characterization of a chlorate-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* with mutations in both nitrate reductase structural genes *NIA1* and *NIA2*. *Mol. Gen. Genet.* 239: 289–297.
- Wilson, I.D., Neill, S.J. and Hancock, J.T. (2008) Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant Cell Environ.* 31: 622–631.
- Zeidler, D., Zähringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., et al. (2004) Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101: 15811–15816.
- Zemojtel, T., Frohlich, A., Palmieri, M.C., Kolanczyk, M., Mikula, I., Wyrwicz, L.S., et al. (2006) Plant nitric oxide synthase: a never-ending story? *Trends Plant Sci.* 11: 524–525.
- Zhao, M.G., Tian, Q.Y. and Zhang, W.H. (2007) Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 144: 206–217.



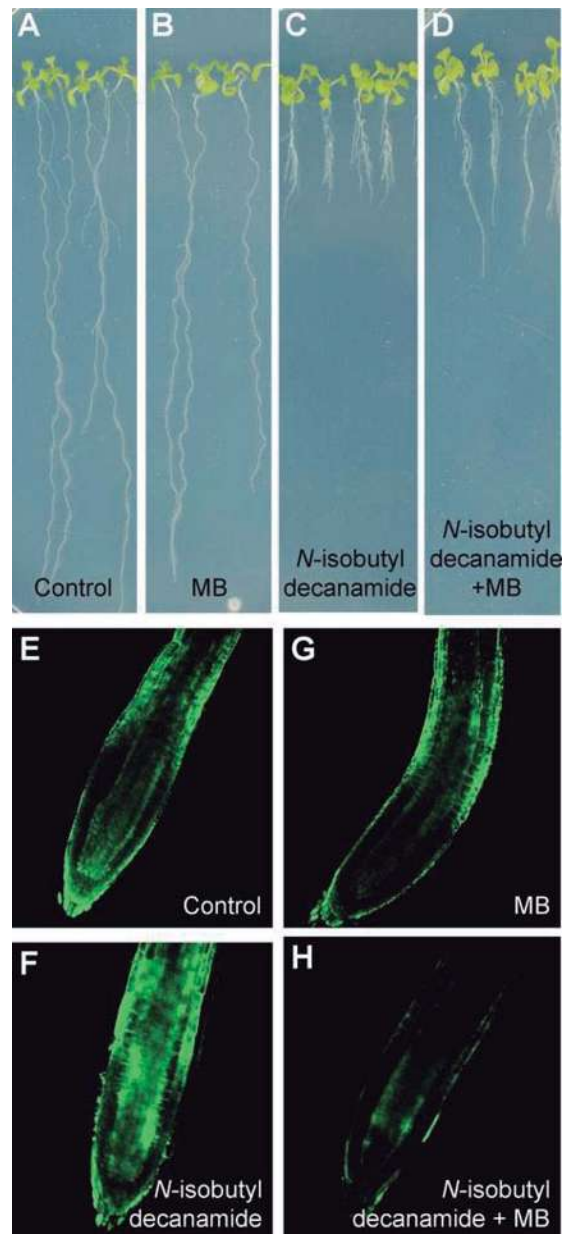
Supplemental Fig. S1. Lateral root emergence induced by *N*-isobutyl decanamide in 7 d-old seedlings. This analysis was performed considering the lateral root formation zone length (A), which comprises the root portion between the root base and the youngest (most-distal) emerged lateral root. Emerged lateral root density was calculated into this zone (B). Different letters are used to indicate means that differ significantly ($P < 0.05$). The experiment was repeated twice with similar results. Bars represent the mean \pm SE



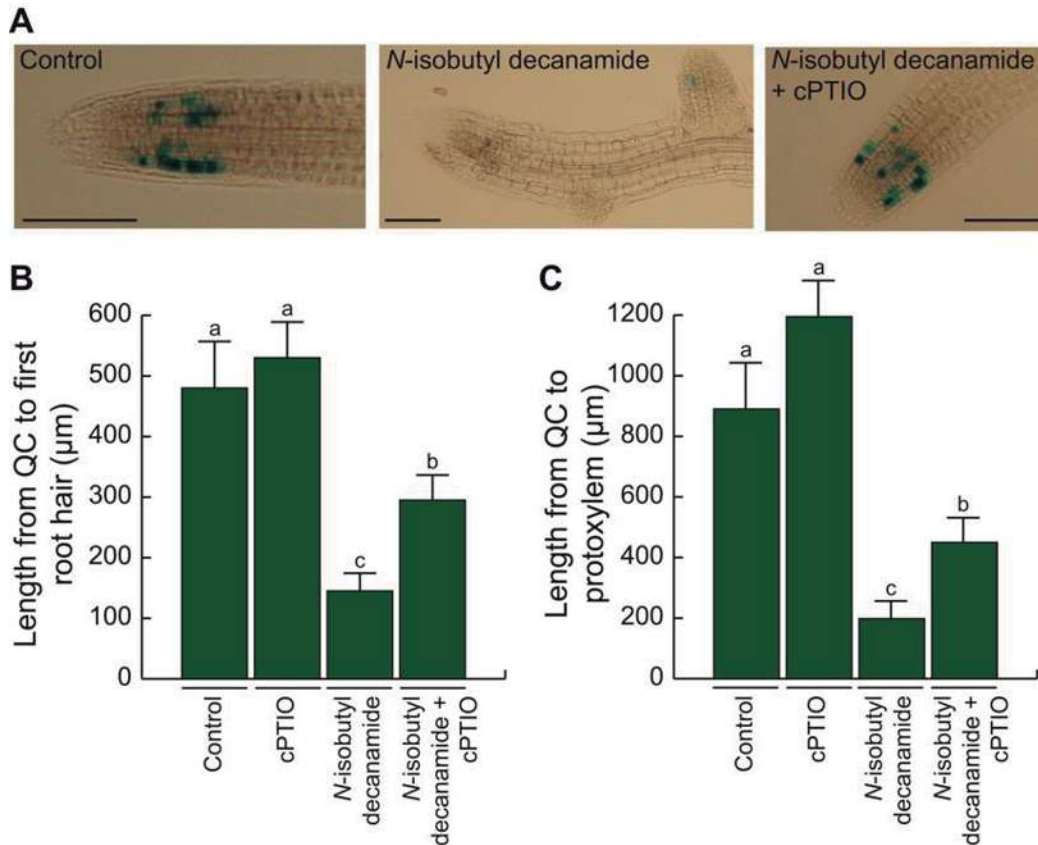
Supplemental Fig. S2 Effects of NO donor SNAP on Arabidopsis root system architecture. WT (Col-0) seedlings were grown for 7-d on agar plates supplied with NO donor SNAP at the indicated concentrations and the length of the primary root (A), lateral root density (B), and whole developmental effects (C) determined for a total of 30 seedlings \pm SE. Different letters are used to indicate means that differ significantly ($P < 0.05$). The experiment was repeated twice with similar results.



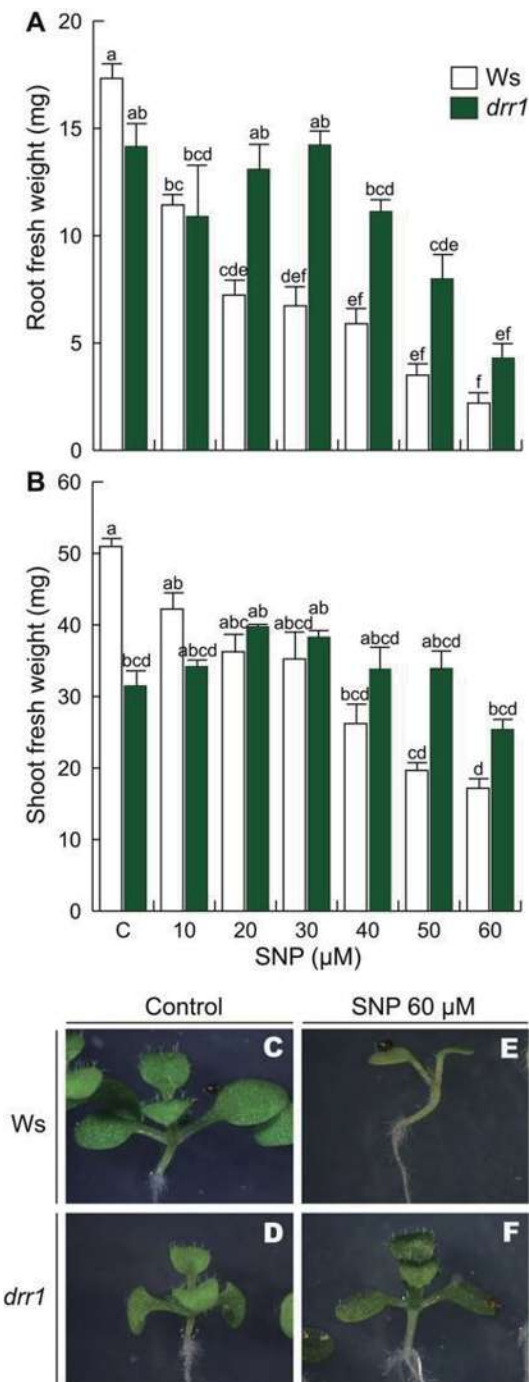
Supplemental Fig. S3 Lateral root initiation induced by NO-donor SNP. (A) Lateral root primordium density, (B) lateral root initiation index, and (C) fully elongated cortical cell length in Col-0 7-d old seedlings. Measurements were done accordingly to Dubrovsky et al. (2009). Different letters indicate statistically significant differences when analyzed by one-way ANOVA and a multiple comparison using Tukey's test at $P < 0.05$ from at least 10 plants per treatment.



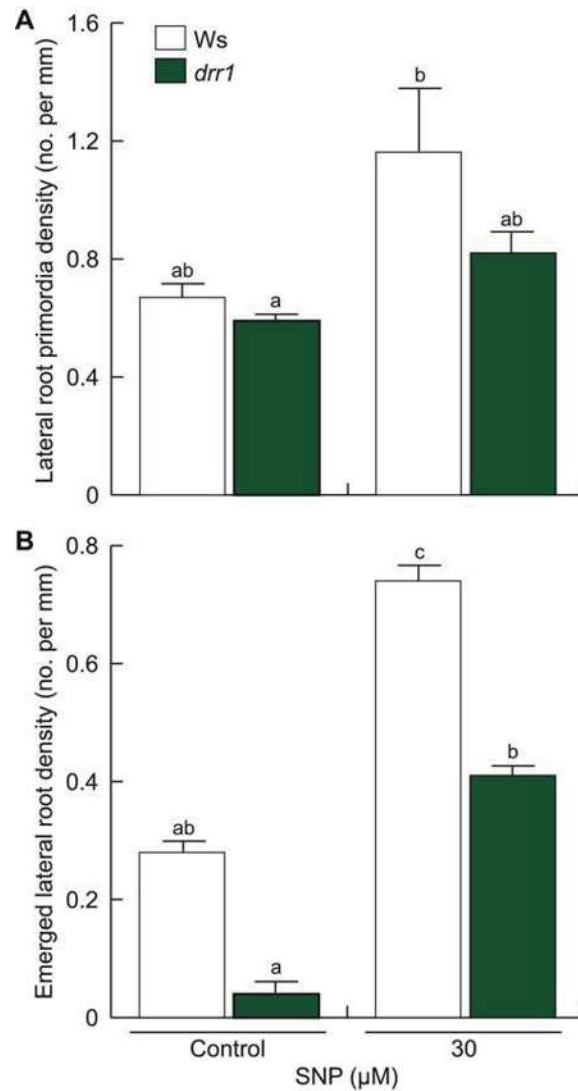
Supplemental Fig. S4 Effect of nitric oxide scavenger methylene blue on root architectural responses to *N*-isobutyl decanamide and NO accumulation. Representative photographs of *Arabidopsis* WT (Col-0) seedlings grown with or without *N*-isobutyl decanamide in the presence or absence of methylene blue (MB). (A) Solvent grown seedlings. (B) Seedlings treated with 1 μ M MB, 25 μ M *N*-isobutyl decanamide (C), or 25 μ M *N*-isobutyl decanamide plus 1 μ M MB (D). NO detection on primary root meristems was revealed by staining with DAF-2DA in control (E), and 25 μ M decanamide (F), 1 μ M MB (G) or 25 μ M decanamide plus 1 μ M MB (H) treated seedlings. A total of 10 seedlings per treatment were analysed by confocal microscopy and representative photographs were taken. The experiment was repeated twice with similar results.



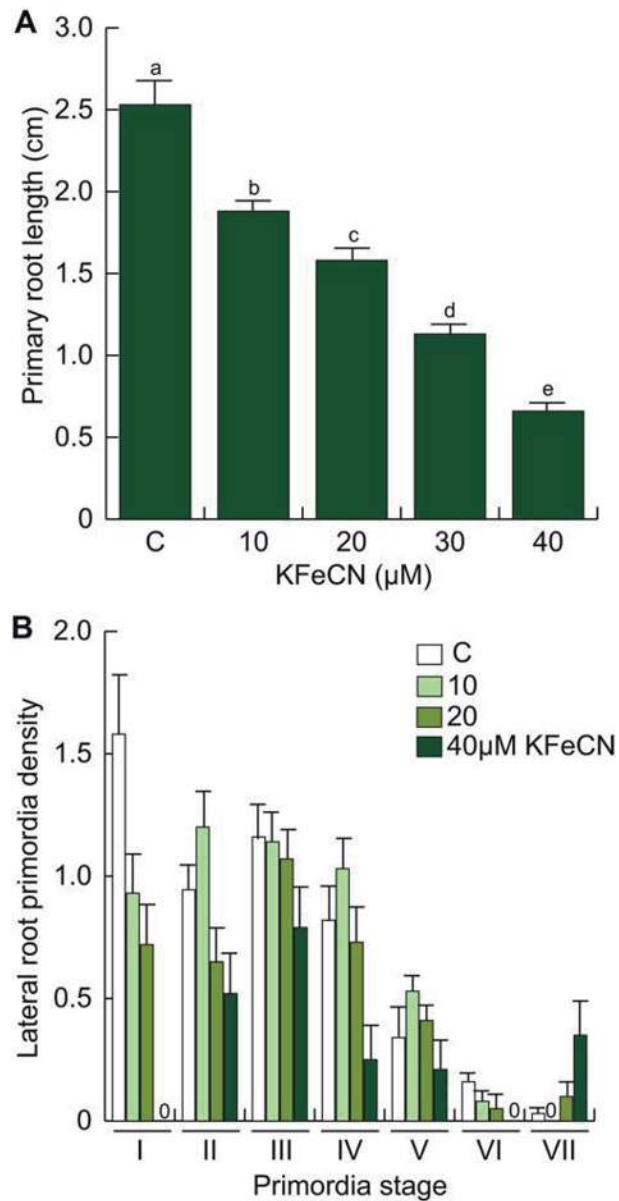
Supplemental Fig. S5 Effects of NO depletion on cell division and differentiation in response to *N*-isobutyl decanamide. *Arabidopsis CycB1:uidA* seedlings were grown for 5 d on MS 0.2X medium and then transferred to plates supplied with 24 μ M *N*-isobutyl decanamide or *N*-isobutyl decanamide plus cPTIO for an additional 4 d period. At this stage, seedlings were stained for GUS activity and cleared to determine mitotic activity. (A) *CycB1:uidA* expression in the primary root meristem. (B) Length from quiescent centre (QC) to first root hair, and (C) length from quiescent centre to the first protoxylem cell. Values shown represent the mean of 30 seedlings \pm SD. Different letters are used to indicate means that differ significantly ($P < 0.05$). The experiment was repeated twice with similar results.



Supplemental Fig. S6 Resistance to growth inhibition induced by SNP in *drr1* mutant seedlings. WT and *drr1* seedlings were grown side by side on 0.2X MS agar medium supplied with the solvent or indicated SNP concentrations. (A, B) root and shoot biomass production from 60 seedlings at 10 d after germination. (C-F) visual effects of SNP on shoot growth in WT and *drr1* plants. Different letters (A and B) are used to indicate means that differ significantly ($P < 0.05$). The experiment was repeated twice with similar results. Bars represent the mean \pm SD.



Supplemental Fig. S7 Induction of lateral root initiation events by SNP in WT (*Ws*) and *drr1* seedlings. Lateral root primordial density was estimated in the zone between most-distal LRP and the youngest (most-distal) emerged lateral root (A). Lateral root density was determined by analyzing the root portion from the root base to the youngest (most-distal) emerged lateral root. Letters indicates statistical differences between treatments from at least 15 plants. Bars represent the means \pm SE.



Supplemental Fig. S8 Effects of KFeCN on Arabidopsis root system architecture. WT (Col-0) seedlings were grown for 7-d on agar plates supplied with KFeCN at the indicated concentrations and the length of the primary root (A), and lateral root primordia density (B) were determined for a total 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.

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; Schuegger 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). Ortíz-Castro et al. (2008) evaluated *Arabidopsis* growth responses to a variety of saturated AHLs ranging from four to 14 carbons in length, focusing on alterations in postembryonic root development. The compounds affected primary root growth, lateral root (LR) formation, and root hair development. While this information clearly indicates that plants are able to sense a variety of small lipid signals, including alkamides, NAEs, and AHLs, which modulate root architecture, the genetic mechanisms involved in signal perception to these compounds are unknown.

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

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

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

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

RESULTS

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

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

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

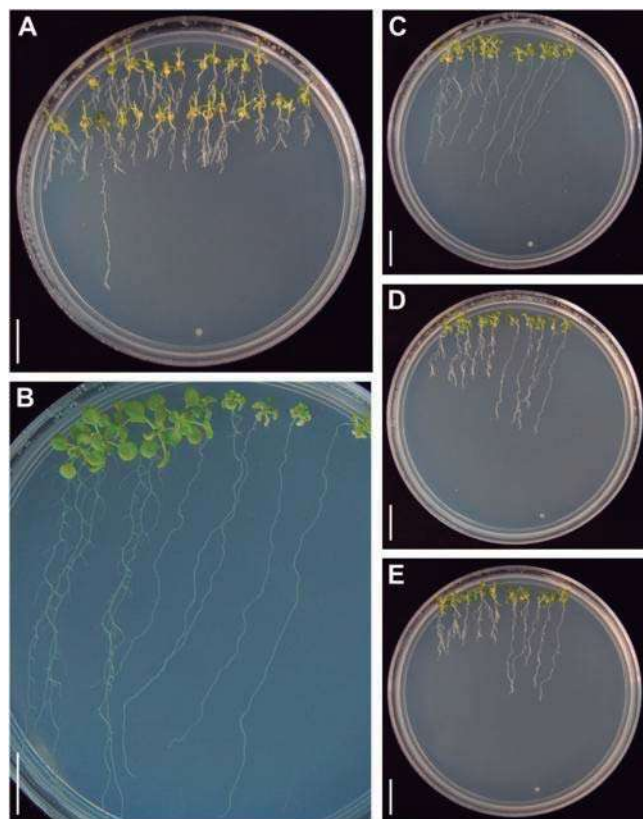


Figure 1. Genetic screen and phenotypic characterization of *drr1* mutants. A, Photograph of an agar plate supplied with 30 μM *N*-isobutyl decanamide showing a putative *drr1* mutant with long primary root. B, Five 14-d-old wild-type (Ws) and *drr1* seedlings grown side by side on the surface of agar 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 LR forming in a gradient from the root/shoot junction to the primary root tip (Fig. 1B). In the same medium, *drr1* mutants developed a long primary root lacking visible LR (Fig. 1B), thus indicating that *DRR1* is important for normal LR development under normal growth conditions. In wild-type plants treated with 20, 25, or 30 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 LR developed, giving rise to a highly exploratory root system with different architecture from that observed in plants grown in medium without *N*-isobutyl decanamide (Fig. 1, C–E). In contrast, alkamide-treated *drr1* mutants showed longer primary roots and reduced LR formation when compared with wild-type plants in most concentrations of *N*-isobutyl decanamide tested (Fig. 1, C–E).

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

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

Table 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 LR (Wild Type)	Few LR (<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.

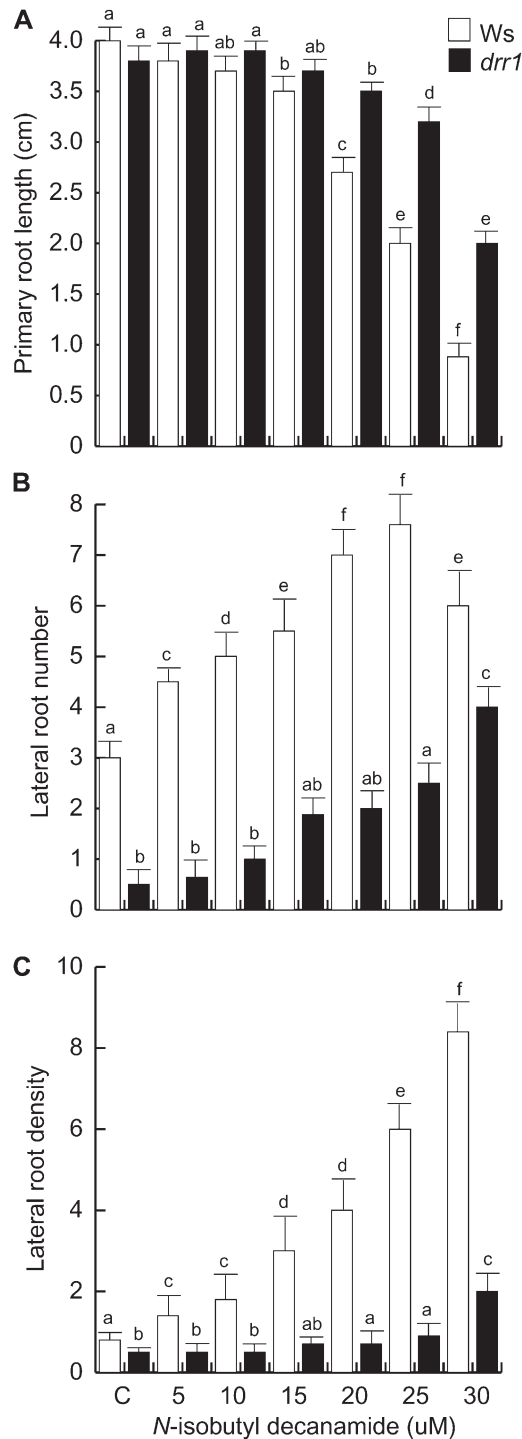


Figure 2. Effects of *N*-isobutyl decanamide on the root system architecture of wild-type (Ws) and *drr1* plants. A, Primary root length. B, Number of emerged LRs per plant. C, LR density expressed as the number of LRs per centimeter. Data were recorded at 12 d after germination. Values shown are means \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,

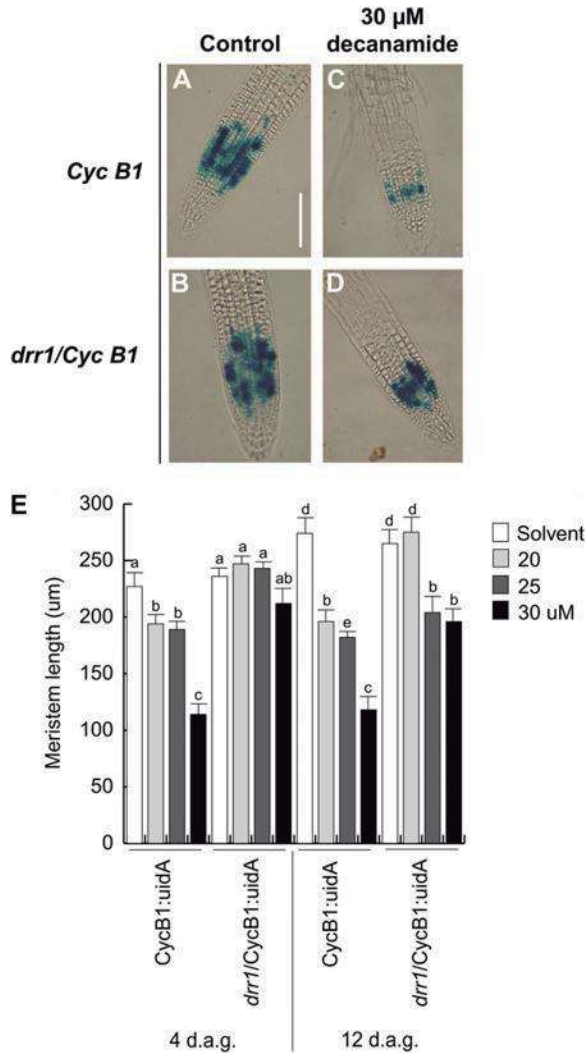


Figure 3. *CycB1:uidA* expression in transgenic wild-type and *drr1* seedlings. Twelve-hour GUS staining is shown for *CycB1:uidA* primary roots in wild-type and *drr1* Arabidopsis seedlings grown on agar-solidified $0.2 \times$ MS medium with or without *N*-isobutyl decanamide. A and B, Solvent-treated seedlings. C and D, Plants supplied with $30 \mu\text{M}$ *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 = $100 \mu\text{m}$. 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 LRAs (Fig. 4). Solvent-treated *drr1* mutants showed similar LRP density to wild-type plants (Fig. 4A) but dramatically decreased density of emerged LRAs (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 LRAs in *drr1* mutants, *drr1* always showed lower LRA 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 LRAs. Mutations in *drr1* interfere with both of these processes.

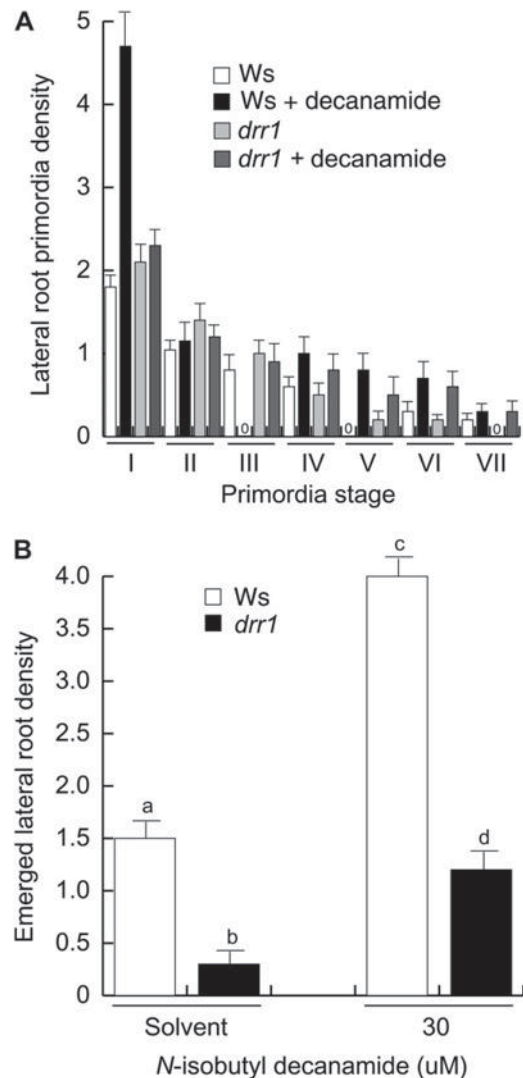


Figure 4. Effects of *N*-isobutyl decanamide on wild-type (Ws) and *drr1* LR development. A, LRP stage distribution in 6-d-old primary roots grown on medium supplied with the solvent only or with $30 \mu\text{M}$ *N*-isobutyl decanamide (indicated as decanamide). B, Emerged LRA density in the same experiment. 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 μM 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

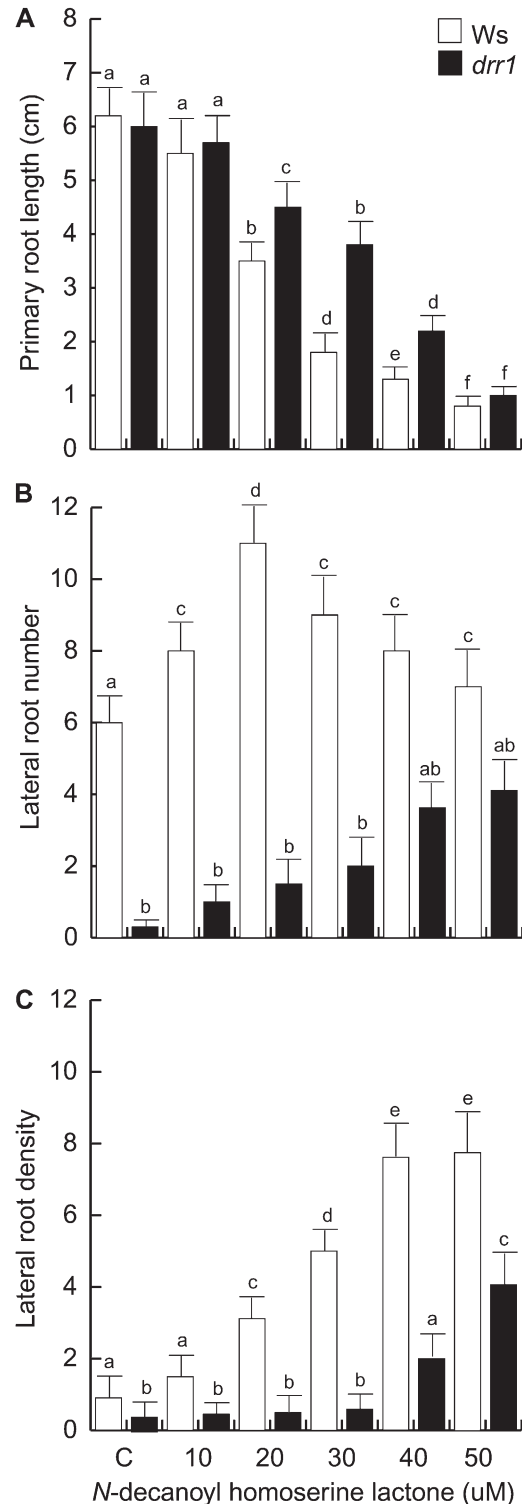


Figure 5. Effects of C10-AHL on the root system architecture of wild-type (*Ws*) and *drr1* plants. A, Primary root length. B, Number of emerged LRs per plant. C, LR density expressed as the number of LRs per centimeter. Data were recorded at 14 d after germination. Values shown are means \pm SD ($n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

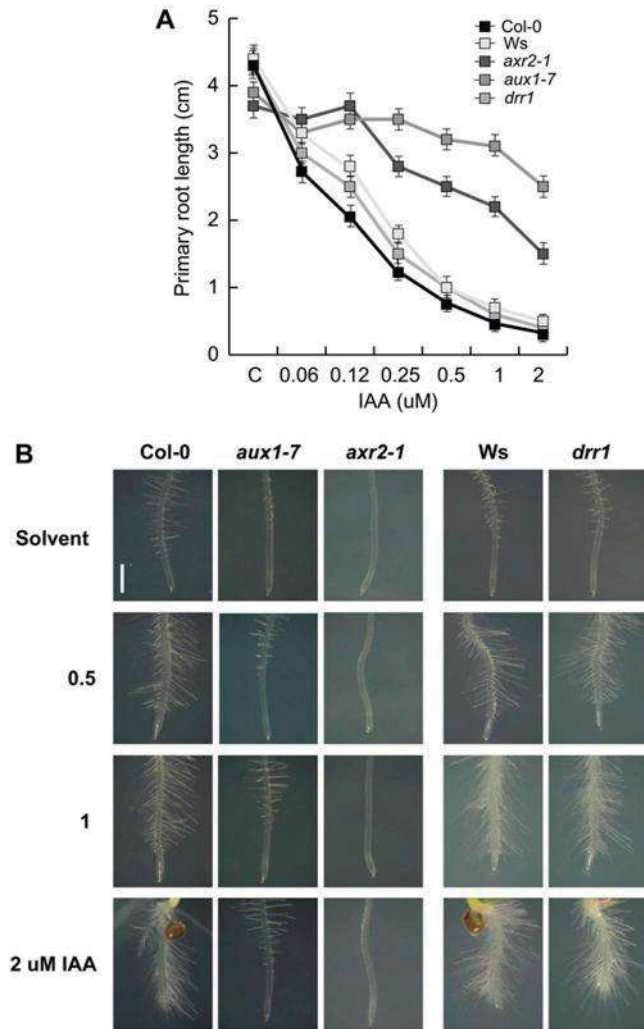


Figure 6. Auxin responses in wild-type and *drr1* seedling roots. A, Primary root growth in 12-d-old primary roots of wild-type (Col-0 and Ws), *auxr2-1* and *aux1-7* auxin-resistant mutants, and *drr1* Arabidopsis mutants grown on medium supplied with the solvent only or with varied IAA concentrations. 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

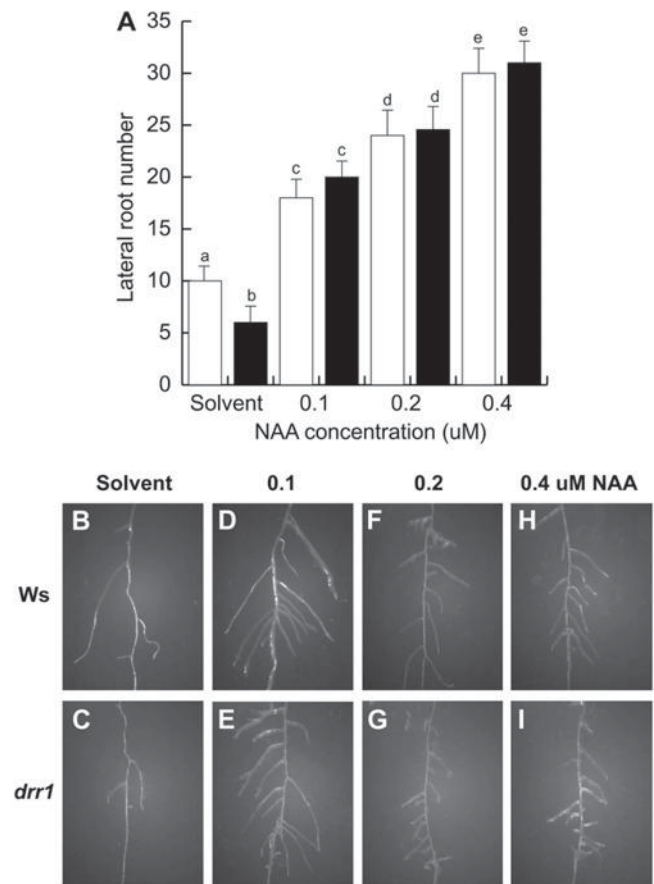
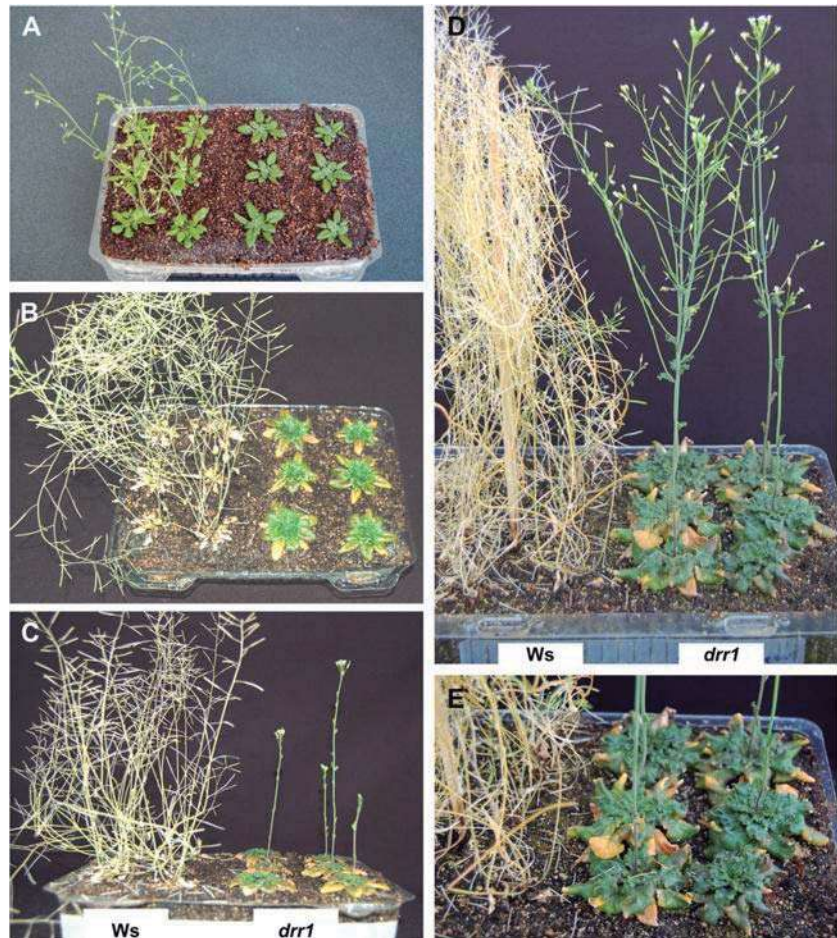


Figure 7. Auxin restoration of LR development in *drr1* plants. A, Total LR number per plant in 11-d-old wild-type (Ws) and *drr1* plants that were first grown for 7 d in $0.2\times$ MS agar medium and then transferred to $0.2\times$ MS liquid medium supplied with the solvent or with varied concentrations 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-

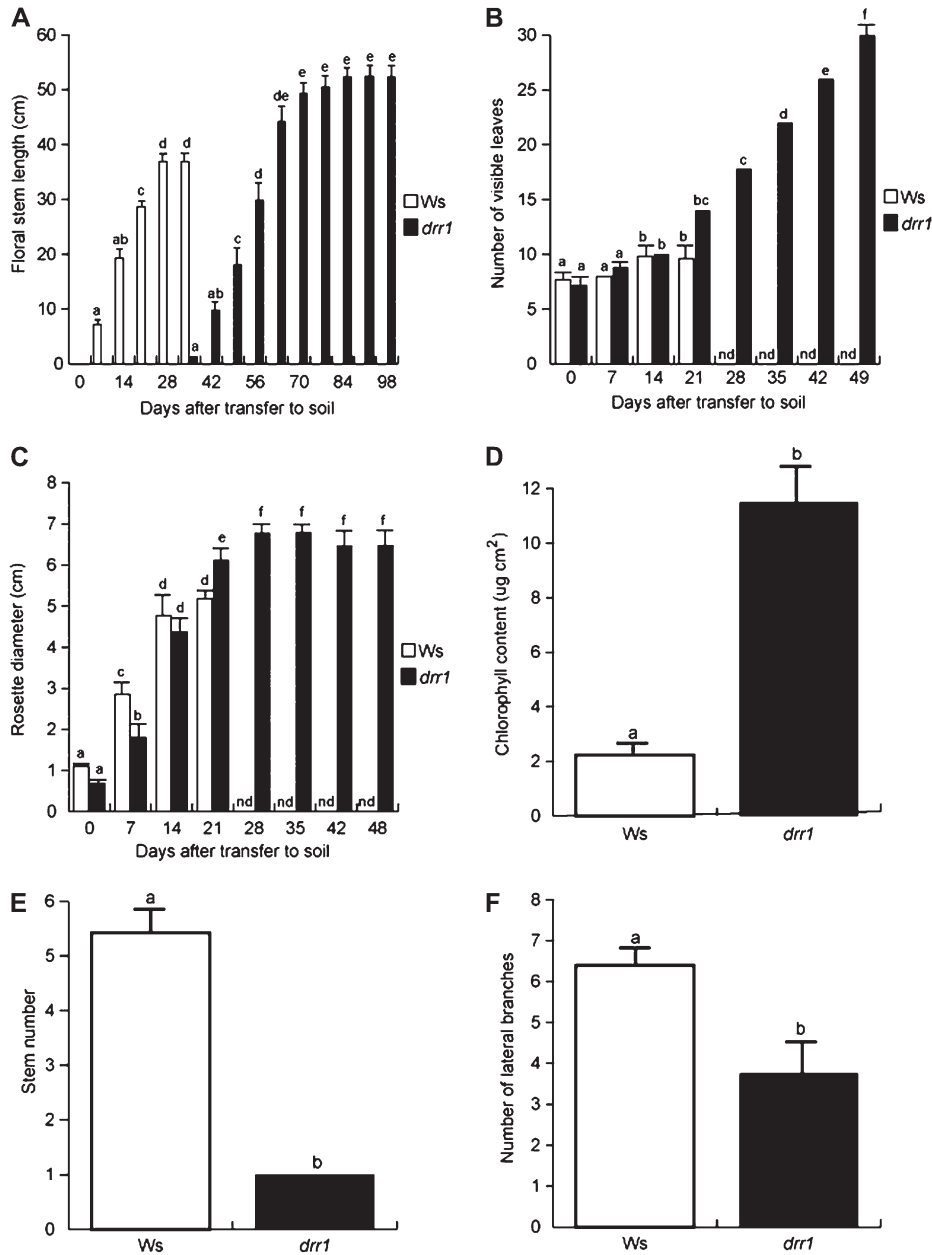


Figure 9. Age-dependent senescence symptoms and other developmental traits of wild-type (Ws) and *drr1* plants grown in soil. A, Age-dependent stem size. B, Rosette diameter. C, Number of visible rosette leaves. D, Chlorophyll content in rosette leaves at 28 d after transfer to soil. E, Stem number. 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.

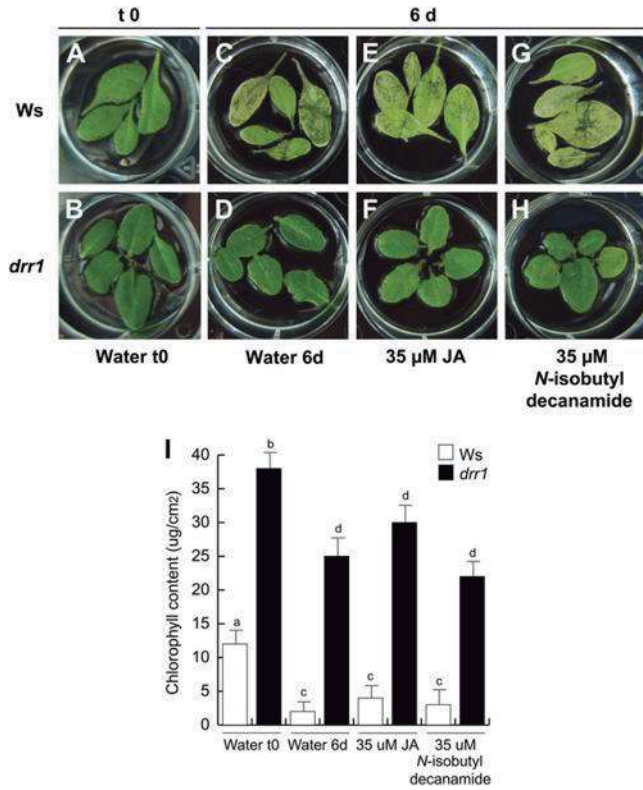


Figure 10. Hormone-dependent senescence symptoms in the *drr1* mutant. Detached leaves of wild-type (*Ws*) and *drr1* plants were incubated in 2-mL water solutions supplied with the indicated concentrations of compounds. The plates were included in a growth chamber (Percival ARR95L) under dark conditions, 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

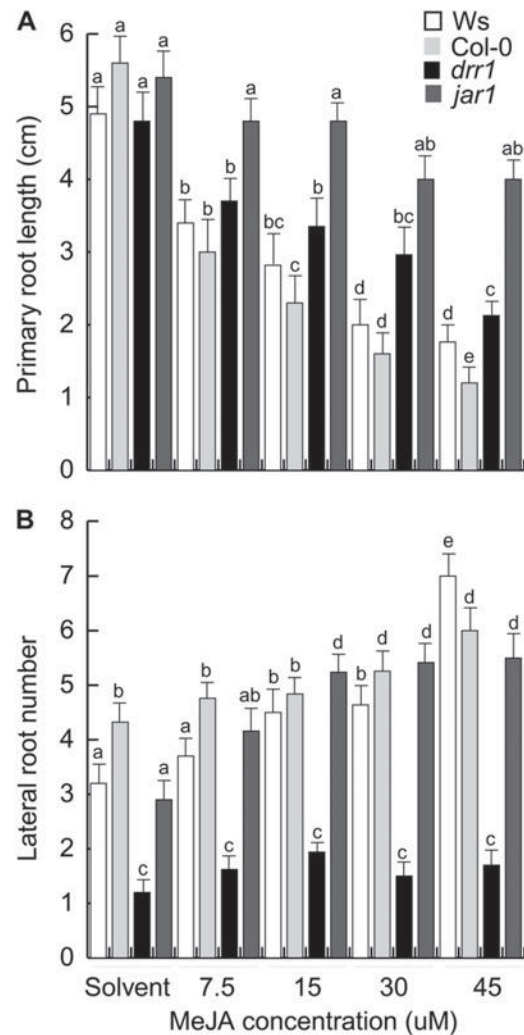


Figure 11. Effects of JA on primary root growth and LR development in wild-type (*Ws* and *Col-0*) and mutant (*drr1* and *jar1*) lines. A, Primary root length. B, Number of emerged LRs per plant. Data were recorded at 12 d after germination. Values shown are means ± SD (*n* = 20). Different letters 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 *drr1* 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). *drr1* 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; Elasmri et al., 2001; Khmel et al., 2002; D'Angelo-Picard et al., 2005). Several strains of *Pseudomonas* have been studied for their ability to colonize plant-related niches, such as the rhizosphere (i.e. *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, and *P. putida*), where they can act as plant growth-promoting rhizobacteria by antagonizing plant-deleterious microorganisms and through the production of traits that directly influence plant disease resistance and growth (Venturi, 2006). The rhizospheric *P. putida* plant beneficial strains WCS358 and IsoF produce 3-oxo-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 *drr1* to C10-AHL on root development opens new possibilities to identify novel genetic determinants involved in plant-bacteria interactions. Furthermore, the *drr1* mutant can be used as a tool to identify novel plant growth-promoting bacterial strains, which could modulate root system architecture through AHL production.

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

sponsible for reduced LR formation in *drr1* mutants. Our results, however, showed that *drr1* mutants are not resistant to IAA or NAA treatments in terms of primary root growth inhibition or LR formation (Figs. 6 and 7), indicating that *DRR1* might not be directly connected to the auxin response pathway to modulate plant growth and development. These results are in agreement with our previous research showing that both 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 *drr1* plants grown in soil under long days (16-h-light/8-h-dark conditions). In *drr1* plants, leaf senescence was delayed by about 4 to 5 weeks when compared with wild-type plants (Figs. 8 and 9). The extended longevity of leaves was related to an extended growth period as well as to slower onset and/or progression of senescence after the maturation stage. The reduced growth observed at early stages of development in *drr1* mutants opens the possibility that it may contribute to extended longevity. Consistent with this hypothesis, we observed that reduced LR formation was not caused by the failure of the pericycle to produce these structures but by the retarded development of LRP to emerge from the primary root (Fig. 4). In this way, the *drr1* mutation shows a senescence character that differs from the delayed leaf senescence phenotype observed in the *oresara* (*ore*) and *teosinte branched/cycloidea/PCF* (*tcp*) mutants described previously (Woo et al., 2001, 2002; Schommer et al., 2008). In *ore* mutants, the retarded senescence phenotype seems to be specifically observed in leaves. For instance, the leaf longevity in *ore9-1* was extended only by about 27%, without affecting other developmental traits such as flowering time and/or plant size (Woo et al., 2001). To our knowledge, no LR phenotypes have been reported for leaf senescence mutants such as the *ore* and *tcp* lines. Interestingly, the *drr1* mutants also show that

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

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

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

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

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

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

MATERIALS AND METHODS

Plant Material and Growth Conditions

Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) wild-type plants (Col-0 and/or Ws ecotypes), the transgenic line *CyCB1:uidA* (Colón-Carmona et al., 1999), and the mutant lines *jar1* (Tiryaki and Staswick, 2002), *axr2-1* (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 (micropropagation 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 ruler. LR number and LR density were determined by counting the LRs present in the primary root from the tip to the root/stem transition. LR density was determined by dividing the LR number by the primary root length and expressed as LR density per centimeter. The length of the meristem was determined as the distance between the quiescent center and the cell file where cells started to elongate. For all experiments, the overall data were statistically analyzed in the SPSS 10 program (SPSS). Univariate and multivariate analyses with a Tukey's posthoc test were used for testing differences in growth and root developmental responses in wild-type and mutant lines. Different letters are used to indicate means that differ significantly ($P < 0.05$).

Determination of Developmental Stages of LRP

LRP were quantified at day 4 after germination. Seedling roots were first cleared to enable LRP at early stages of development to be visualized and counted. Each LR primordium was classified according to its stage of development as reported by Malamy and Benfey (1997). The developmental stages are as follows. Stage I, LRP initiation; in the longitudinal plane, approximately eight to 10 "short" pericycle cells are formed. Stage II, the formed LR primordium is divided into two layers by a periclinal division. Stage III, the outer layer of the primordium divides 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 alkamides 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, Dhooze S, Swarup R, Graham N, Inzé D, Sandberg G, Casero PJ, et al (2001) Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* 13: 843–852
- Celenza JL, Grisafi PL, Fink GR (1995) A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* 9: 2131–2142
- Cha C, Gao P, Chen YC, Shaw PD, Farrand SK (1998) Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by Gram-negative plant-associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 11: 1119–1129
- Chapman KD (2004) Occurrence, metabolism, and prospective functions of *N*-acylethanolamines in plants. *Prog Lipid Res* 43: 309–327
- Colón-Carmona A, You R, Haimovich-Gal T, Doerner P (1999) Spatio-

- temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J* **20**: 503–508
- D'Angelo-Picard C, Faure D, Penot I, Dessaux Y (2005) Diversity of *N*-acyl homoserine lactone-producing and -degrading bacteria in soil and tobacco rhizosphere. *Environ Microbiol* **7**: 1796–1808
- De Smet I, Vaneste S, Inzé D, Beeckman T (2006) Lateral root initiation or the birth of a new meristem. *Plant Mol Biol* **60**: 871–887
- Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B (1993) Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* **119**: 71–84
- Dubrovsky JG, Rost TL, Colón-Carmona A, Doerner P (2001) Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **214**: 30–36
- Dubrovsky JG, Sauer M, Napsucially-Mendivil S, Ivanchenko MG, Friml J, Shiskova S, Celenza J, Benkova E (2008) Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 8790–8794
- Elasri M, Delorme S, Lemanceau P, Steward G, Laue B, Glickmann E, Oger PM, Dessaux Y (2001) Acyl-homoserine lactone production is more common among plant-associated *Pseudomonas* spp. than among soil borne *Pseudomonas* spp. *Appl Environ Microbiol* **7**: 1796–1808
- Fukaki H, Okushima Y, Tasaka M (2007) Auxin-mediated lateral root formation in higher plants. *Int Rev Cytol* **256**: 111–137
- Fukaki H, Tameda S, Masuda H, Tasaka M (2002) Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the *solitary root/IAA14* gene of *Arabidopsis*. *Plant J* **29**: 153–168
- Fukaki H, Tasaka M (2009) Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Mol Biol* **69**: 383–396
- Gil P, Dewey E, Friml J, Zhao Y, Snowden KC, Putrill J, Palme K, Estelle M, Chory J (2001) BIG: a calossin-like protein required for polar auxin transport in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **15**: 1985–1997
- Himanen K, Boucheron E, Vaneste S, de Almedida-Engler J, Inzé D, Beeckman T (2002) Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell* **14**: 2339–2351
- Hobbie L, Estelle M (1994) Genetic approaches to auxin action. *Plant Cell Environ* **17**: 525–540
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusion: 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 F, Williams P (2000) The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin *N*-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenyl-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
- Parke 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) *Acmella radicans* var. *radicans*: in vitro culture establishment and alkamide content. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **39**: 37–41
- Rogg LE, Lasswell J, Bartel B (2001) A gain-of-function mutation in *IAA28* suppresses lateral root development. *Plant Cell* **13**: 465–480
- Schommer C, Palatnik J, Aggarwal P, Chetelat A, Cubas P, Farmer E, Nath U, Weigel D (2008) Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. *PLoS Biol* **6**: 1991–2001
- Schuegger R, Ihring A, Gantner S, Bahnweg G, Knappe C, 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 amidinenin, 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 μM 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

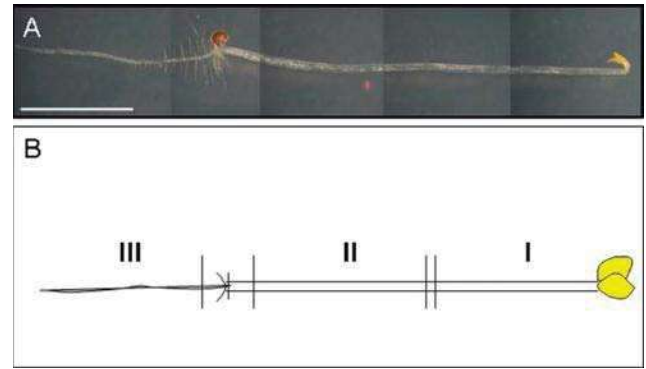


Fig. 1. Dark grown *A. thaliana* plants as a source of explants. *A. thaliana* (Col-0) seeds were sown in 0.2 \times MS agar medium and grown for 7 d under dark conditions. (A) Representative 7 d seedling used as an explant source. (B) Distribution of explants from seedling regions. Scale bar = 0.5 cm.

to promote adventitious rooting. These explants developed fully expanded leaves at later times, which proceeded 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 μM *N*-isobutyl decanamide showed a roughly twofold increase in adventitious root number ($C = 3.7 \pm 0.7$; 24 $\mu\text{M} = 7.2 \pm 0.4$; 36 $\mu\text{M} = 7.5 \pm 0.3$; 48 $\mu\text{M} = 6.4 \pm 0.5$) (Fig. 3A). On the contrary, treatments of 24–60 μM *N*-isobutyl decanamide had an inhibitory effect on adventitious root growth (Fig. 3B).

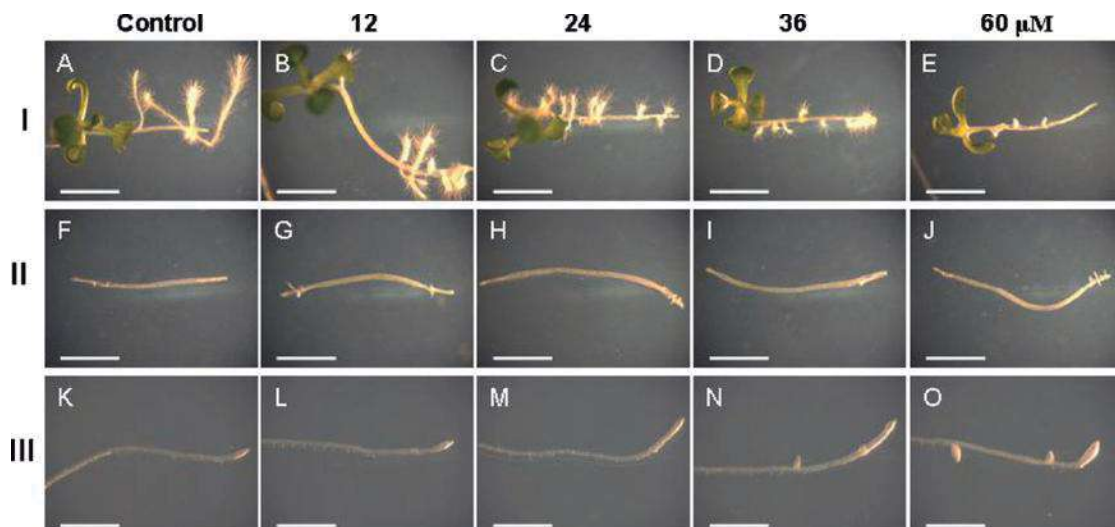


Fig. 2. Growth and developmental responses of *A. thaliana* explants to *N*-isobutyl decanamide. Representative photographs were taken from plants grown for 12 d under the indicated alkamide concentrations. Photographs were taken at 1.5 \times magnification in a Leica MZ6 stereoscopic microscope. Scale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

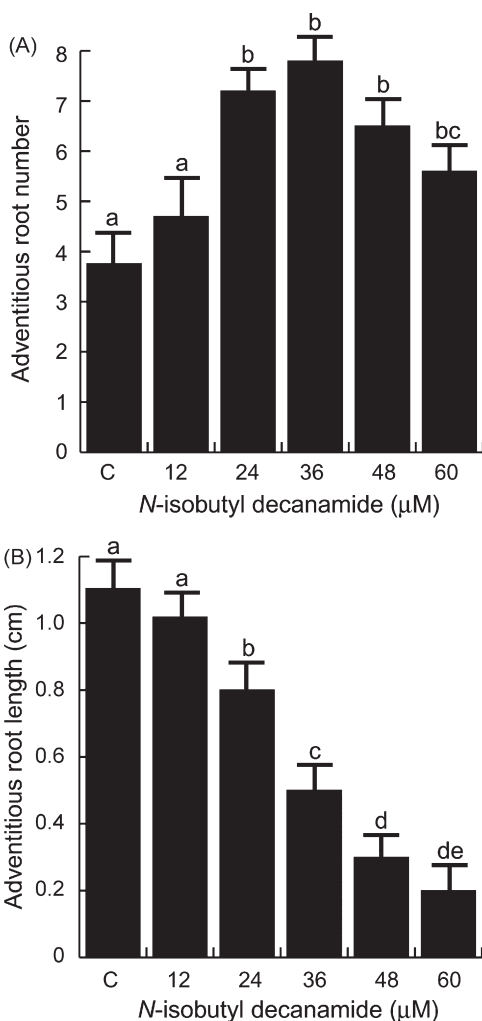


Fig. 3. Effect of *N*-isobutyl decanamide on adventitious root development from type I explants. *A. thaliana* (Col-0) hypocotyl explants were transferred to MS 0.2× medium containing the indicated alkamide concentrations. Plants were grown for a further 14 d period and the number (A) and length (B) of adventitious root recorded. Values shown represent the mean ± 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

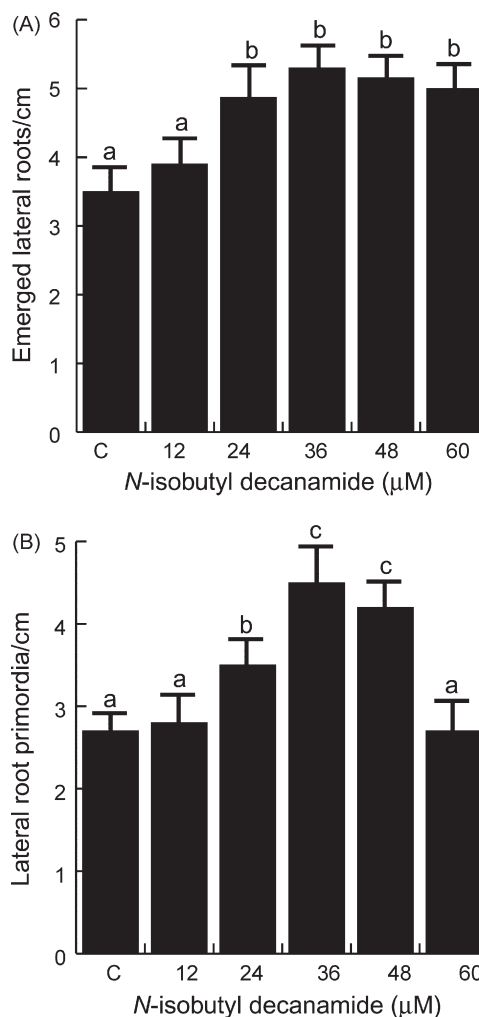


Fig. 4. Effect of *N*-isobutyl decanamide on lateral root development from type III explants. *A. thaliana* (Col-0) primary root explants were transferred to MS 0.2× medium containing the indicated alkamide concentrations. Plants were grown for a further 14 d period and the number of emerged roots (A) and total LRP (B) recorded. Values shown represent the mean ± 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/

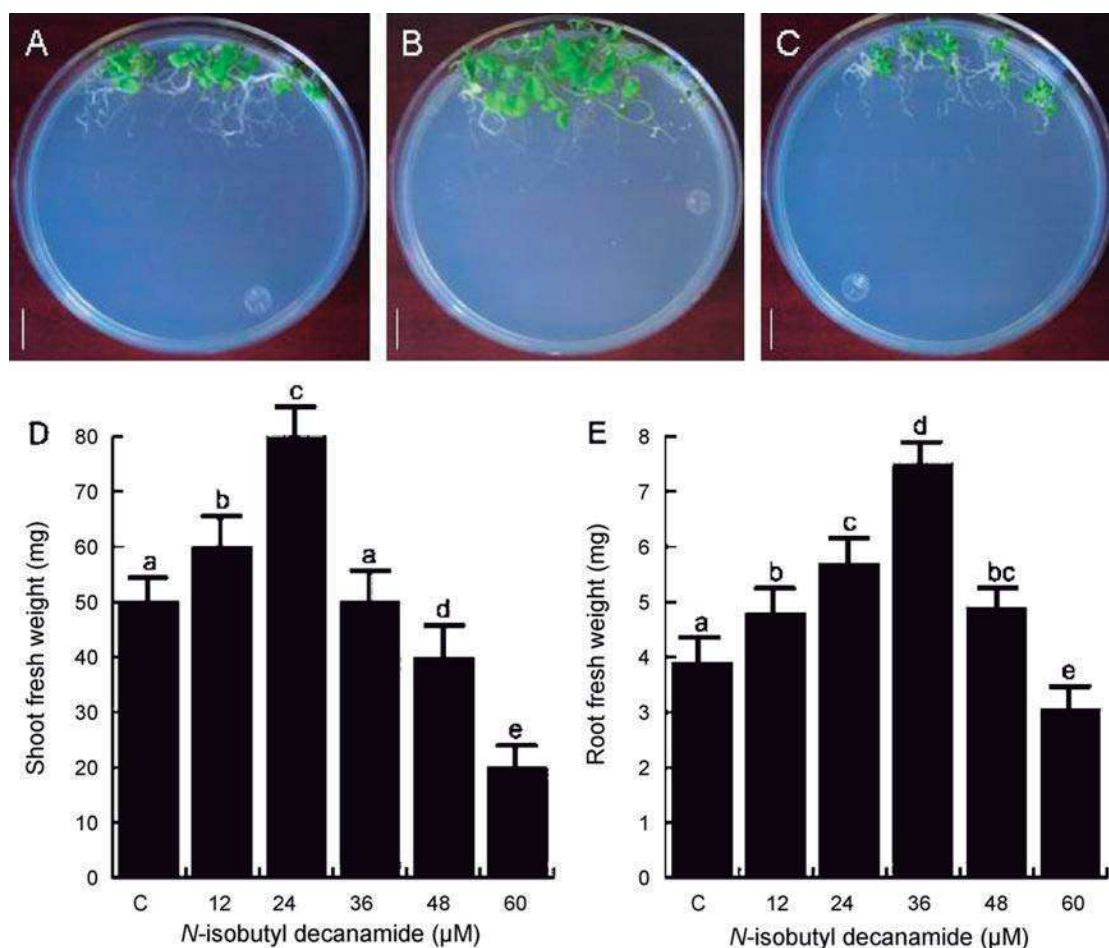


Fig. 5. Effect of *N*-isobutyl decanamide on growth of regenerated *A. thaliana* plants. Type I *A. thaliana* explants were obtained from 7 d dark-grown plants, transferred to MS 0.2× media containing the indicated *N*-isobutyl decanamide concentrations and grown for a further 27 d period. Representative 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

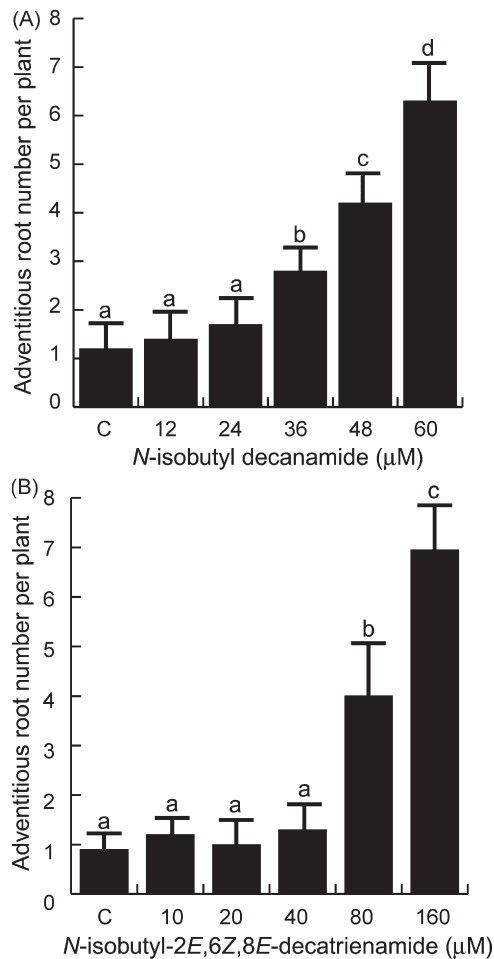


Fig. 6. Effect of alkamides on adventitious root development in *A. thaliana* (Col-0) seedlings. Plants were germinated and grown for 14 d under the indicated alkamide concentrations. (A) Number of adventitious roots per plant in *N*-isobutyl decanamide treatments. (B) Number of adventitious roots per plant in *N*-isobutyl-2*E*,6*Z*,8*E*-decatrienamamide (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

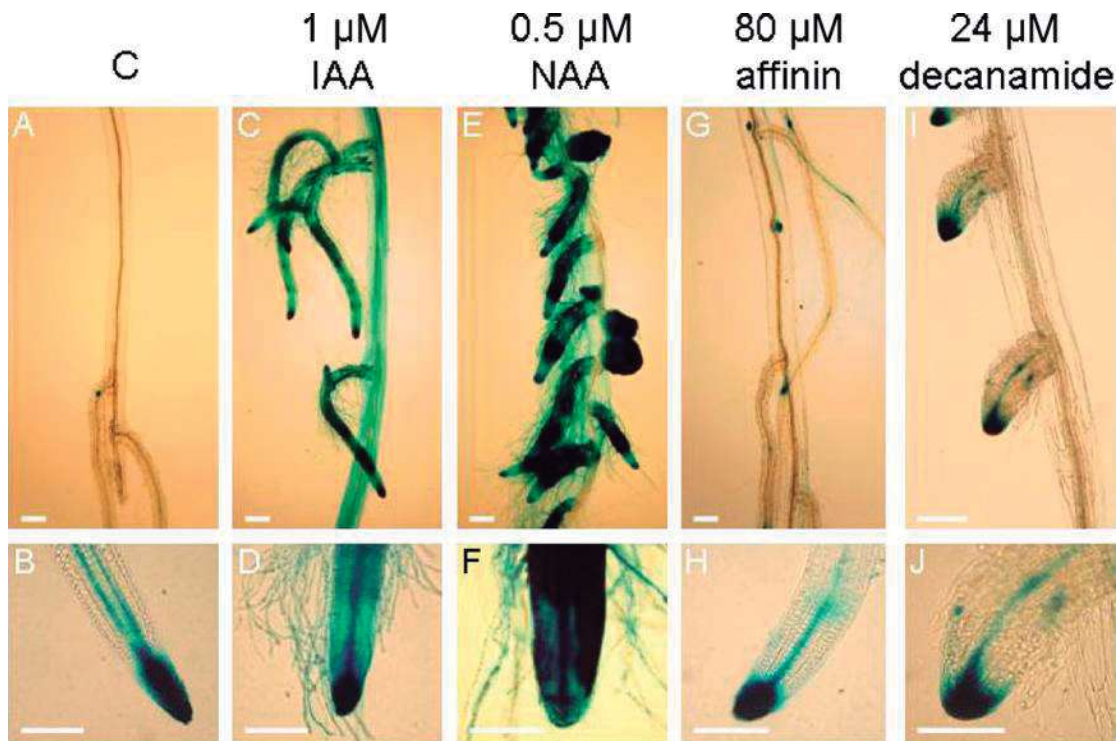


Fig. 7. Effect of alkamides on auxin-regulated gene expression. (A and B) Twelve hours of GUS staining of *DR5:uidA* type I explants grown for 14 d in medium without auxin, (C and D) under 1 μM IAA, (E and F) 0.5 μM NAA, (G and H) 80 μM affinin or (I and J) 24 μM *N*-isobutyl decanamide. Photographs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

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],

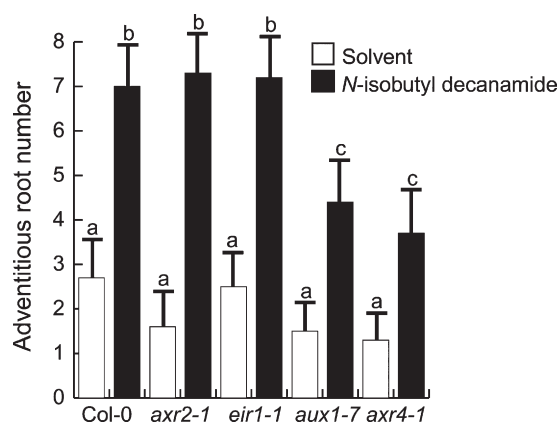


Fig. 8. Adventitious root response of wild-type (Col-0) and auxin-resistant mutants to *N*-isobutyl decanamide. Type I explants were obtained from all plant genotypes and grown for 14 d on MS 0.2 \times medium with or without 24 μM *N*-isobutyl decanamide. Values shown represent the mean adventitious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

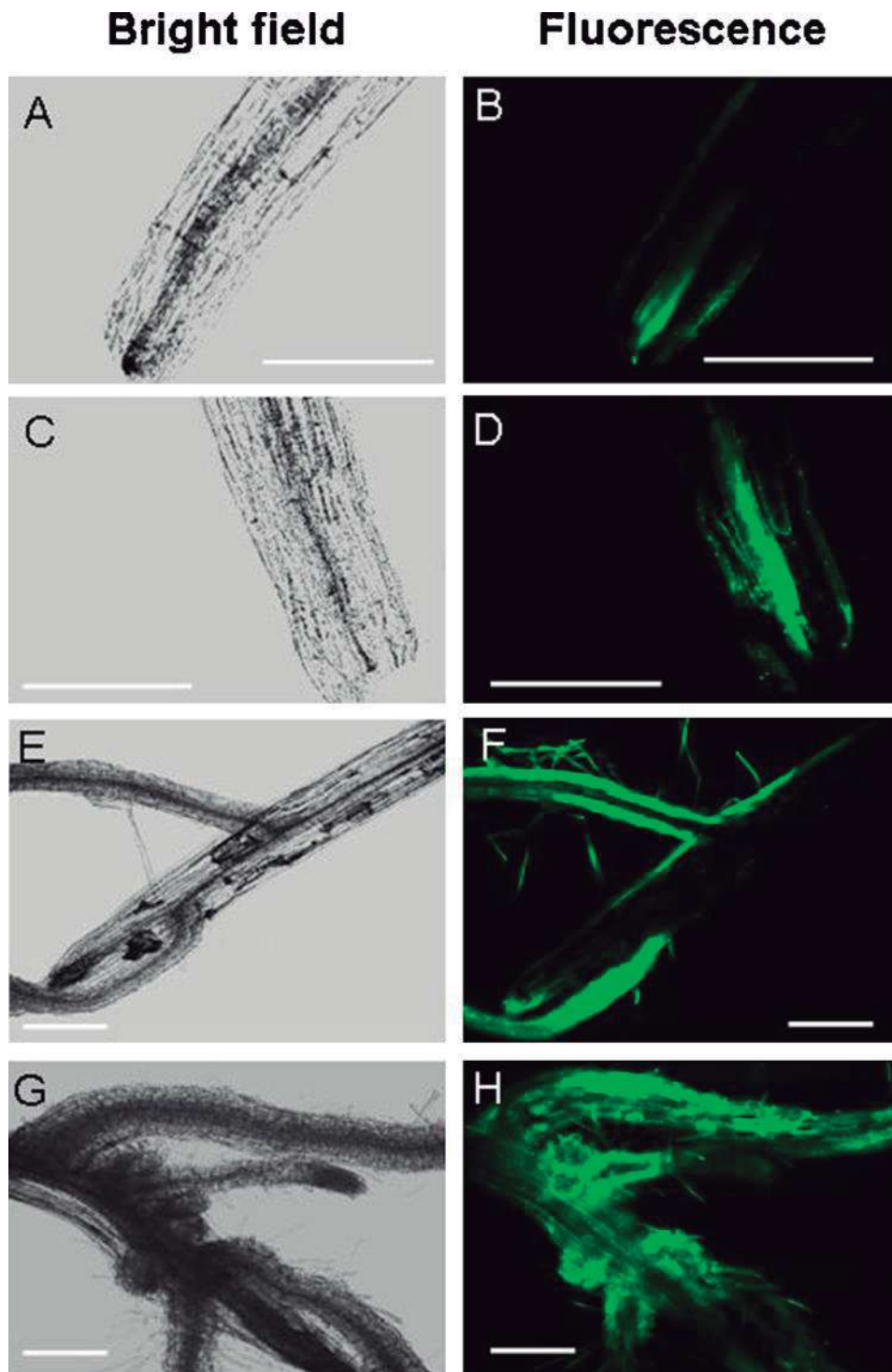


Fig. 9. Effect of *N*-isobutyl decanamide on NO accumulation in *A. thaliana* (Col-0) explants. (A and B) NO accumulation in type I explants grown for 36 h in medium without alkamide, or (C and D) under 36 μ M *N*-isobutyl decanamide. (E and F) NO accumulation in explants grown for 14 d in medium without 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 μ M IAA or 0.5 μ M NAA induced *DR5:uid* expression in shoot explants, whereas concentrations up to 24 μ M of *N*-isobutyl decanamide or 80 μ M 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 *xipol1* 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*-lauroylethanolamide, 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*-acylethanolamides in plants, *Prog. Lipids Res.* 43 (2004) 309–327.
- [7] Y.S. Wang, R. Shresta, 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*-acylethanolamines, *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. Timppe, 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: diamino fluoresceins, *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.

Metabolismo y señalización del óxido nítrico en plantas

Javier Raya-González, Elda Beltrán-Peña y José López-Bucio

El óxido nítrico (ON) es un radical producido de manera endógena en los organismos que está involucrado en la comunicación y transducción de señales a nivel intra e inter celular. En animales, el ON se produce mediante al menos tres mecanismos, 1) La actividad de la ON sintasa, 2) La actividad de la nitrato reductasa, y 3) Por mecanismos no enzimáticos. El ON modula la actividad de proteínas por la nitrosilación y probablemente por la nitración de residuos de tirosina. La nitrosilación es un proceso reversible que ejerce el ON sobre las proteínas modificando su conformación, incidiendo así en diferentes procesos de gran relevancia biológica. En los últimos años se ha evidenciado que el ON se encuentra presente en las plantas participando como mensajero en diferentes procesos fisiológicos y del desarrollo que incluyen la muerte celular programada, la inducción de genes de defensa y la regulación de la arquitectura radicular. A pesar del conocimiento generado hasta la fecha, existe información limitada acerca de cómo el ON ejerce estos efectos. En este capítulo se presentan los avances más recientes acerca del metabolismo y señalización del ON en las plantas.

10.1 Introducción

El óxido nítrico (ON) es un radical libre de naturaleza gaseosa, el cual se describió inicialmente en células animales como un mediador biológico que participa en procesos importantes como la transmisión del impulso eléctrico, la inflamación y la relajación del músculo liso (Schmidt y Walter, 1994). La identificación de las enzimas que catalizan la síntesis de ON, así como el descubrimiento que el ON controla la actividad de proteínas específicas a través de procesos químicos dentro de los organelos, produjo las primeras evidencias de los mecanismos de acción del ON a nivel molecular (Hanafy *et al.*, 2001; Kone *et al.*, 2003; Stuehr *et al.*, 2004).

En las plantas, se ha confirmado que el ON se encuentra presente regulando una amplia gama de procesos celulares y fisiológicos, incluyendo la resistencia a enfermedades (Delledonne *et al.*, 1998), el cierre de los estomas (Neill *et al.*, 2002), promoviendo la floración (He *et al.*, 2004), reduciendo la dormancia de la semilla (Bethke *et al.*, 2006) y estimulando la germinación (Beligni y Lamattina 2000). Estos efectos ocurren mediante diferentes mecanismos como la activación de la vía de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPKs) (Kumar y Klessig, 2000; Pagnussat *et al.*, 2004), modulando la expresión de genes que participan en el ciclo celular (Correa-Aragunde *et al.*, 2006) e inhibiendo la actividad enzimática. Adicionalmente, el ON interactúa con rutas hormonales modulando la expresión génica. En *Arabidopsis*, el ON regula la expresión de una gran cantidad de genes involucrados en la síntesis y respuesta a ácido jasmónico (Orozco-Cárdenas y Ryan, 2002; Jih *et al.*, 2003), genes de respuesta a patógenos (Durner *et al.*, 1998), en la señalización y síntesis de etileno, de fotosíntesis, de muerte celular y genes que controlan procesos metabólicos básicos (Polverari *et al.*, 2003). Gran parte de estos resultados se han obtenido mediante la aplicación de donadores para emular la producción de ON tales como el nitroprusiato de sodio (SNP), atrapadores de ON como es el 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (PTIO) o el 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO) para remover la señal (Goldstein *et al.*, 2003). La acumulación de ON en los

diferentes tejidos vegetales se ha estudiado con el uso de compuestos fluorescentes como el 4,5- diacetato de fluoresceína (DAF-2 DA), el cual emite una luz fluorescente cuando se une al N_2O_3 formado por la reacción del ON con NO_2 . Diferentes investigadores descubrieron que el ON se produce no solo a partir de nitrato sino también a partir de L-arginina, y este aminoácido representa el principal sustrato para la síntesis de ON en las células animales (Corpas *et al.*, 2006; Crawford *et al.*, 2006). En este capítulo se presentará la información básica sobre la biosíntesis y señalización del ON en animales, se discutirán resultados recientes sobre la síntesis del ON en plantas, sus efectos celulares y mecanismos de acción.

10.2 Participación del óxido nítrico en la señalización en animales

El ON se produce principalmente por la óxido nítrico sintasa (NOS), la cual cataliza la oxidación dependiente de NADPH de L-arginina a L-citrulina y ON (Stuehr *et al.*, 2004). El ON es un gas difusible y ejerce su actividad biológica por medio de la modificación de proteínas a través de la unión a metales de transición y la modificación covalente de residuos de cisteína (Cys; S-nitrosilación) y tirosina (Tyr; nitración de tirosina) (Figura 10.1).

Se han identificado más de 100 proteínas como blancos del ON *in vitro* y/o *in vivo*. Estas proteínas participan en actividades celulares esenciales (Tabla 10.1). Una de las proteínas que interactúan con el ON es la guanilato ciclasa soluble (sGC; Hanafy *et al.*, 2001). La interacción del ON con el grupo hemo de la sGC resulta en la formación de un complejo hemo-nitrosil, el cual incrementa la actividad enzimática y la concentración de 3',5'-monofosfato de guanosina cíclico (cGMP). De acuerdo a varios estudios, este mecanismo prepara a la célula para transmitir una señal dependiente de ON sobre sustratos río abajo (downstream) de cGMP, como son las proteínas cinasas dependientes de cGMP (PKGs) y los canales que se abren por nucleótidos cíclicos (CNGCs). En las proteínas, el ON también muestra reactividad química

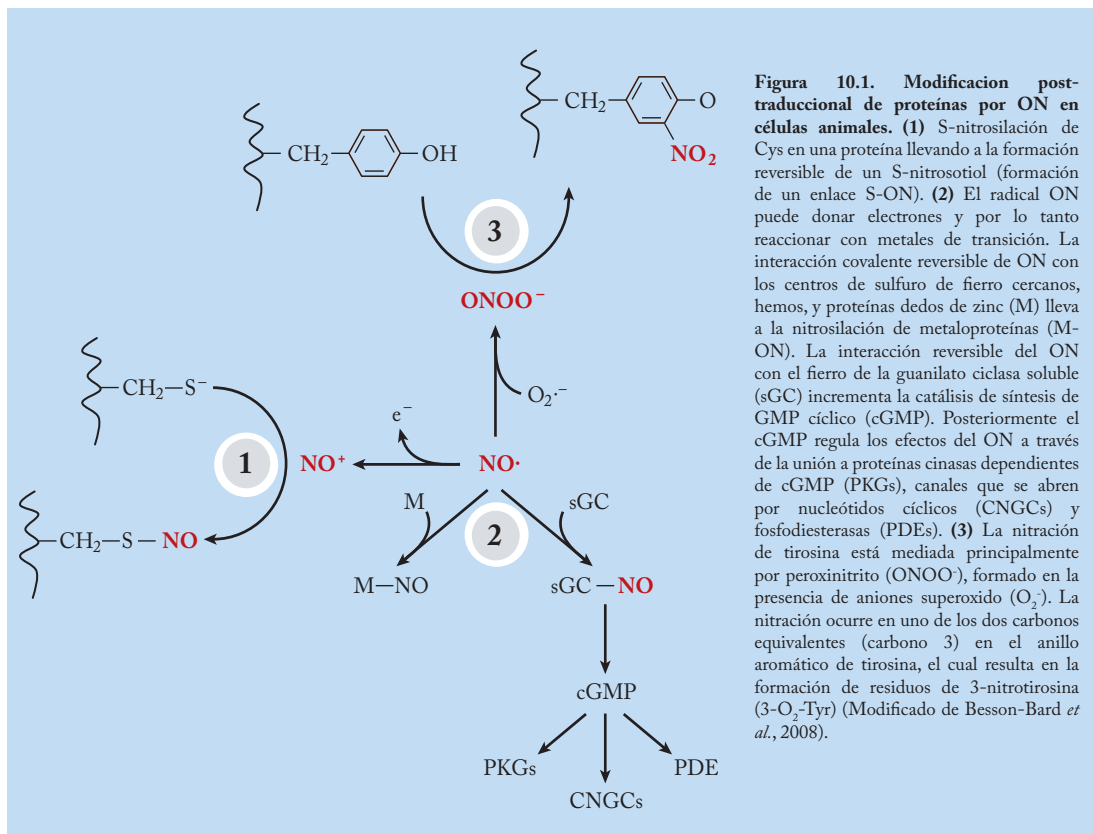


Figura 10.1. Modificación post-traduccional de proteínas por ON en células animales. (1) S-nitrosilación de Cys en una proteína llevando a la formación reversible de un S-nitrosotiol (formación de un enlace S-ON). (2) El radical ON puede donar electrones y por lo tanto reaccionar con metales de transición. La interacción covalente reversible de ON con los centros de sulfuro de hierro cercanos, hemos, y proteínas dedos de zinc (M) lleva a la nitrosilación de metaloproteínas (M-ON). La interacción reversible del ON con el hierro de la guanilato ciclasa soluble (sGC) incrementa la catálisis de síntesis de GMP cíclico (cGMP). Posteriormente el cGMP regula los efectos del ON a través de la unión a proteínas quinasas dependientes de cGMP (PKG)s, canales que se abren por nucleótidos cíclicos (CNGCs) y fosfodiesterasas (PDEs). (3) La nitración de tirosina está mediada principalmente por peroxinitrito (ONOO^-), formado en la presencia de aniones superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). La nitración ocurre en uno de los dos carbonos equivalentes (carbono 3) en el anillo aromático de tirosina, el cual resulta en la formación de residuos de 3-nitrotirosina ($3\text{-O}_2\text{-Tyr}$) (Modificado de Besson-Bard *et al.*, 2008).

hacia centros hierro-azufre o grupos nucleofílicos tales como tioles, aminas o carboxilos (Hanafy *et al.*, 2001). Trabajos recientes han implicado a la S-nitrosilación en la regulación de la vía de señalización que involucra proteínas G de bajo peso molecular, proteínas quinasas y canales permeables a Ca^{2+} y en el control de la vía de señalización de la *N*-metil D-aspartato (NMDA) que media el flujo del Ca^{2+} post-sináptico en neuronas. En este último modelo, la estimulación del receptor de NMDA (NMDAR), conduce a un rápido y localizado influjo de Ca^{2+} , el cual promueve la activación de la NOS neuronal dependiente de calmodulinas (CaM). Una vez producido, el ON nitrosila a la proteína G de bajo peso molecular $\rho 21^{\text{ras}}$. La cascada de señalización termina cuando NMDAR se inhibe por la S-nitrosilación en un solo residuo de Cys.

Como se mencionó anteriormente, otro de los procesos por medio del cual el ON puede afectar la

señalización celular es la nitración en tirosinas (Tyr) (Figura 10.1), involucrando agentes nitrantes como es el peroxinitrito (ONOO^-) (Schopfer *et al.*, 2003). El peroxinitrito se forma por la reacción del ON con el ión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Este es altamente reactivo y se ha involucrado en la toxicidad del ON en enfermedades necróticas y apoptosis (Lin *et al.*, 1995). Al igual que el ON, el Ca^{2+} también es un segundo mensajero ubicuo en los organismos. Las fluctuaciones de las concentraciones de este catión dependen de su distribución en los diferentes compartimentos celulares y a su compleja regulación espacial y temporal (Petersen *et al.*, 2005). Los canales y transportadores de Ca^{2+} responden a una señal proveniente de estímulos fisiológicos incluyendo mensajeros intracelulares o extracelulares, la despolarización o hiperpolarización de la membrana y estímulos térmicos o mecánicos. Trabajos realizados en diferentes modelos animales indican que muchos de los

Tabla 10.1. Ejemplos de proteínas blanco del óxido nítrico involucradas en la señalización en células animales.

Modificación post-traducciona	Proteínas blanco	Efecto sobre la actividad
S-nitrosilación	Cinasas / Fosfatasas	
	- Fosfato de tirosina 1B	- Inhibición
	- Cinasa de tirosina Src	- Activación
	- Cinasa 1 de la señalización de apoptosis (ASK1)	- Inhibición
	GTPasas	
	- p21ras	- Activación
	- Dexras	- Activación
	Canales / transportadores	
	-Receptores de <i>N</i> -metil D-aspartato	- Inhibición
	Receptores de rianodina	- Activación
	Canales abiertos por nucleótidos cíclicos	- Activación
	Canales de Ca ²⁺ tipo L	- Activación/Inhibición
	Canales de K ⁺ activados por Ca ²⁺	- Activación
	Canales de Na ⁺	- Inhibición
	Ca ²⁺ -ATPasas	- Activación
	Factores de transcripción	
	Oxy R*	- Activación
	Factores inducibles por hipoxia	- Activación
	Supresor tumoral p53	- Activación
	Factor nuclear kB	- Inhibición
Metal-nitrosilación	Guanilato ciclasa soluble	- Activación
	Proteinas reguladoras de fierro (IRP1)	- Activación
	Factor de transcripción SoxR*	- Activación
	Sintasa de óxido nítrico	- Inhibición
Nitración de tirosina	Cinasa de tirosina Src	- Activación
	Fosfatasa de tirosina	- Inhibición

canales y transportadores involucrados en el control de la homeostasis de Ca^{2+} parecen estar modulados por ON (Clementi, 1998). El ON actúa directamente sobre los canales y/o los transportadores, o bien indirectamente interactuando con elementos cascada abajo en la ruta de señalización.

10.3 Producción de óxido nítrico en plantas

En las plantas se han documentado dos vías enzimáticas distintas que participan en la generación de ON: una vía dependiente de nitrato/nitrito y otra dependiente de L-Arg (Figura 10.2). La primera vía involucra la nitrato reductasa (NR) citosólica (Yamasaki y Sakihama, 2000) y la reductasa de nitrito a ON (Ni-NOR) de la membrana plasmática específica de células de la raíz (Stohr *et al.*, 2001). La NR cataliza la producción *in vitro* de ON a través de la reducción de un electrón del nitrito, vía el uso del NAPH como un donador de electrones (Yamasaki y Sakihama, 2000). Estudios *in vivo* indican que la NR puede ser responsable de la producción basal de ON en las hojas y las raíces de varias especies (Rockel *et al.*, 2002; Vanin *et al.*, 2004); este proceso está controlado por el estado de fosforilación de la enzima (Lea *et al.*, 2004). La primera evidencia descrita del papel de la NR como una fuente de ON en procesos de transducción de señales surgió mediante el análisis de la mutante

de *Arabidopsis* deficiente en NR *nia1/2*, la cual es resistente a los efectos del ácido abscísico (ABA) sobre el cierre de los estomas, lo que indica que la síntesis de ON mediada por NR es un paso importante en la señalización de ABA en células guardianas (Bright *et al.*, 2006; Desikan *et al.*, 2004). Además de la NR, la Ni-NOR está involucrada en la formación de ON a partir de nitrito, pero exclusivamente en raíces. La actividad de la Ni-NOR está coordinada con la NR, la cual posteriormente reduce nitrato a nitrito y a su vez produce ON (Stohr *et al.*, 2001). La Ni-NOR puede estar involucrada en varios procesos fisiológicos de la raíz, incluyendo el desarrollo, la respuesta a anoxia y eventos de simbiosis con microorganismos (Stohr y Stremlau, 2006). La identidad molecular de la Ni-NOR se desconoce. También se han reportado otros mecanismos dependientes de nitrito para la síntesis de ON, estos incluyen la reducción química de nitrito a ON en pH ácido en el apoplasto y una producción mitocondrial en la cual la reducción a ON está dirigida por la cadena de transporte de electrones (Planchet *et al.*, 2005). Aunque no hay ningún homólogo de la NOS animal en el genoma de *Arabidopsis*, la vía dependiente de L-Arg puede involucrar una enzima parecida a la NOS. Apoyando esto, se han detectado actividades similares a NOS en varios tejidos de plantas y en organelos purificados, incluyendo la mitocondria, el núcleo y los peroxisomas (Barroso *et al.*, 1999; Corpas *et al.*, 2006; Cueto *et al.*, 1996).

Una búsqueda para la enzima que cataliza esas actividades en *Arabidopsis* llevó a la clonación del gen *AtNOS1*, el cual codifica una enzima mitocondrial

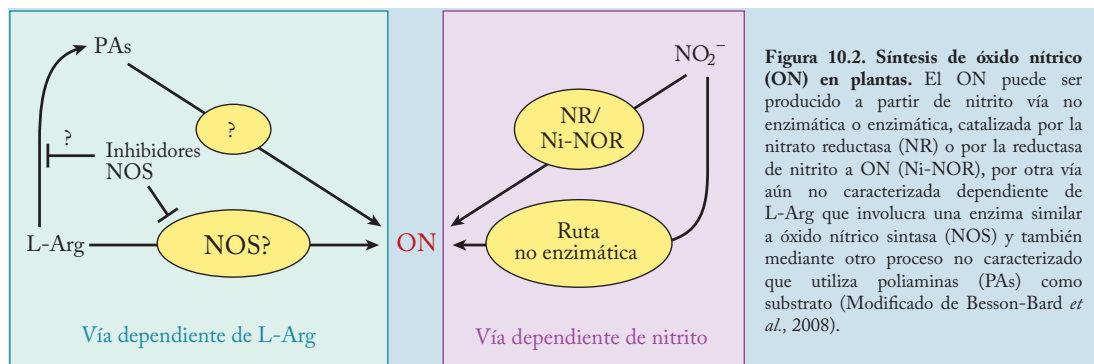


Figura 10.2. Síntesis de óxido nítrico (ON) en plantas. El ON puede ser producido a partir de nitrito vía no enzimática o enzimática, catalizada por la nitrato reductasa (NR) o por la reductasa de nitrito a ON (Ni-NOR), por otra vía aún no caracterizada dependiente de L-Arg que involucra una enzima similar a óxido nítrico sintasa (NOS) y también mediante otro proceso no caracterizado que utiliza poliaminas (PAs) como sustrato (Modificado de Besson-Bard *et al.*, 2008).

que muestra secuencias similares con una proteína involucrada en la síntesis de ON en el caracol *Helix pomatia* (Guo y Crawford, 2005; Guo *et al.*, 2003). La contraparte de esto es que la AtNOS1 no está estructuralmente relacionada con la NOS animal clásica. Estudios genéticos para elucidar las funciones de AtNOS1 han revelado que esta enzima juega un papel clave en la transición floral (He *et al.*, 2004) y es la fuente principal de ON en la señalización modulada por ABA (Guo *et al.*, 2003) y lipopolisacáridos (LPS) (Zeidler *et al.*, 2004). Aunque la mutante *Atnos1* de *Arabidopsis* deficiente en AtNOS1 claramente posee un bajo nivel de ON en diversas condiciones de crecimiento, la capacidad de la AtNOS1 recombinante para mostrar actividad de NOS fue recientemente cuestionada (Crawford *et al.*, 2006; Zemojtel *et al.*, 2006). Un estudio sobre el alineamiento de secuencias y el análisis estructural, indica que la *AtNOS1* puede funcionar como una GTPasa involucrada en la biogénesis de las mitocondrias y/o procesos de traducción. Debido a que la mitocondria es una importante fuente de ON (Guo y Crawford 2005; Guo *et al.*, 2003), esto puede explicar por qué la síntesis de ON está reducida en la mutante *Atnos1*. El cuestionamiento acerca de que AtNOS1 sea o no un homólogo de la NOS animal, ha entrado en debate por dos razones: Primero se ha cuestionado la técnica del ensayo de L-citrulina para medir la actividad NOS utilizada en estos primeros reportes. En este experimento, los extractos de proteínas se incuban en una mezcla de reacción conteniendo los cofactores para NOS y L-Arg radioactiva, la mezcla de reacción es cargada sobre una resina de intercambio catiónico, la cual une L-Arg pero no L-citrulina, el producto de la actividad NOS. El principal problema con este método es que otras enzimas, distintas de la NOS, pueden usar L-Arg radioactiva como un sustrato. Segundo, los análisis farmacológicos al utilizar inhibidores de NOS de mamíferos sobre la actividad de enzimas parecidas a la NOS en plantas pueden tener una limitada especificidad en las células vegetales, ya que al utilizar un inhibidor derivado de L-Arg puede afectar la actividad de otras enzimas que metabolizan L-Arg, como es arginosuccinato liasa, así como también a la arginasa y/o arginina descarboxilasa, primera enzima de la vía biosintética de las poliaminas (PAs). De ahí que las PAs, espermina y espermidina induzcan una

síntesis rápida de ON en varios tejidos de plántulas de *Arabidopsis*. En este sentido, Yamasaki y Cohen (2006), sugieren la presencia de una enzima desconocida que sería responsable de la conversión directa de PAs a ON. En este escenario, la capacidad de los inhibidores de NOS de mamíferos para suprimir la síntesis de ON en plantas puede estar relacionado con su capacidad para inhibir la arginasa y/o arginina descarboxilasa e indirectamente reprimir la síntesis de ON derivado de las PAs (**Figura 10.2**).

10.4 Señalización del óxido nítrico en plantas

El ON puede reaccionar con distintas metaloproteínas de plantas. La lipoxigenasa 1 contiene hierro en su estructura y cataliza la hidropoxidación del ácido linoleico (Nelson, 1987). La exposición del hierro de la lipoxigenasa 1 al ON lleva a la formación de un complejo metal-nitrosil. Interesantemente, a pH9, el ON y el ácido linoleico compiten para unirse al hierro de la lipoxigenasa 1. Debido a que el sustrato se une muy cerca del hierro, se puede asumir que el ON y el ácido linoleico ocupan sitios sobrelapados. Además de la lipoxigenasa 1, se observó que las hemoglobinas simbióticas (leghemoglobina) y no simbióticas, que se dividen en clase 1 y 2 respecto a su afinidad por el O₂, interactúan con el ON. La hemoglobina simbiótica se encuentra presente en nódulos de raíz de leguminosas donde facilita el transporte de O₂ hacia las bacterias que fijan el nitrógeno. Usando resonancia paramagnética electrónica, Mathieu *et al.* (1998) detectaron la presencia de un complejo entre el Fe_{II} de la leghemoglobina y el ON (Lb-ON) en nódulos de raíz de plantas de soya. El complejo Lb-ON está presente en alta concentración en nódulos jóvenes, sugiriendo la participación del ON en la regulación de la fijación del nitrógeno. La oxy-leghemoglobina (oxyLb), formada en nódulos de *Medicago truncatula* durante la simbiosis, es también capaz de interactuar con ON y ONOO⁻ (Herold y Puppo 2005).

La clase 1 de hemoglobinas no simbióticas son un blanco importante del ON. Estas proteínas, de manera

similar a las hemoglobinas animales, participan en respuestas a estrés, como hipoxia (Dordas *et al.*, 2003; Perazzolli *et al.*, 2004). Perazzolli *et al.*, (2004) demostró que la interacción de Fe_{II} de la hemoglobina clase 1 (AHb1) de *A. thaliana* con el ON resultó en la formación de un complejo nitrosil y una rápida oxidación de AHb1 dependiente de ON. AHb1 también metaboliza nitrosoglutatión (GSNO) a través de un ciclo catalítico similar, este proceso llega a estar acompañado por la S-nitrosilación de la proteína. Sin embargo, aún no está claro si la actividad de atrapar ON por parte de las hemoglobinas es un simple mecanismo de destoxificación o si éste es también un medio para activar respuestas fisiológicas. Con base en esta información, se sugiere que la S-nitrosilación es un mecanismo de modificación post-traduccional que regula la función de proteínas en las plantas. Usando el método de "biotin switch", un procedimiento en el cual la cisteína S-nitrosilada del nitrosotiol es remplazada químicamente por una cisteína biotinizada, Lindermayr *et al.* (2005) identificó más de 100 proteínas S-nitrosiladas a partir de cultivos celulares de *A. thaliana* y hojas expuestas a ON generado artificialmente. Esas proteínas están relacionadas al estrés oxidativo, señalización, estructura celular y metabolismo. El ON regula la actividad de la metionina adenosiltransferasa (MAT). MAT cataliza la síntesis de la S-adenosilmetionina, un sustrato para la biosíntesis del etileno. MAT1, una de las tres isoformas MAT de *A. thaliana*, es inhibida por GSON *in vitro* a través de la S-nitrosilación de la cisteína 114 (Lindermayr *et al.*, 2006). Tratamientos con GSON en cultivos celulares de *A. thaliana* mostraron una disminución en la producción de etileno, sugiriendo que la S-nitrosilación de MAT1 inducida por ON puede tener una función regulatoria sobre la biosíntesis de etileno y la regulación de la interacción entre las vías de señalización hormonales.

A diferencia del conocimiento generado de los procesos basados en la S-nitrosilación, se conoce menos acerca de la nitración de tirosina como un posible efecto del ON. Como se mencionó anteriormente, la nitración de la tirosina es mediada por el peroxinitrito (ONOO⁻). Aunque experimentos basados en el uso de donadores o atraparadores de ON sugieren la participación del ONOO⁻ en funciones fisiológicas de la planta, la detección de este radical en los tejidos vegetales no ha sido reportada hasta la fecha. La única demostración

detallada en donde la nitración de tirosina puede ocurrir en plantas fue realizada por Morot-Gaudry-Talarmin *et al.*, (2002) quienes usaron un método inmunológico basado en anticuerpos monoclonales dirigidos contra 3-nitrotirosina (3-NO₂Tyr). Los autores encontraron un incremento de la nitración de tirosina en las proteínas en una línea antisentido de nitrato reductasa (NR) de tabaco, mostrando alta concentración de nitrito y aumentando la emisión de ON dependiente de NR. El ON generado puede inducir la síntesis de cGMP en varias especies de plantas y activar cascadas de señalización que modulan la expresión génica (Durner *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2005).

La combinación de herramientas farmacológicas, incluyendo el uso de análogos de cGMP, inhibidores de sGC y fosfodiesterasas ha proporcionado información sobre las funciones de la cascada ON-cGMP. Algunos de los ejemplos es la regulación del crecimiento y la reorientación de los tubos del polen (Prado *et al.*, 2004), de la muerte celular (Clarke *et al.*, 2000), la inducción de la expresión y la actividad de la fenilalanina amonio liasa (Durner *et al.*, 1998), la organogénesis de la raíz inducida por auxinas (Pagnussat *et al.*, 2003) y la modulación del gravitropismo (Hu *et al.*, 2005). Varios estudios indican que el ON puede mediar estos efectos biológicos a través de la movilización de un segundo mensajero, el Ca²⁺. El ON generado artificialmente tiene la capacidad para inducir: (i) un incremento en la concentración de Ca²⁺ citosólico libre ([Ca²⁺]_{cyt}) en células guardianas de *Vicia faba* y células de tabaco (García-Mata *et al.*, 2003; Lamotte *et al.*, 2006); y (ii) una rápida y sostenida absorción de Ca²⁺ extracelular en cultivos celulares de tabaco (Lamotte *et al.*, 2004). Mediante análisis farmacológicos se observa que el incremento de [Ca²⁺]_{cyt} inducido por ON es sensible a inhibidores de canales de Ca²⁺ de la membrana plasmática y/o intracelular. En particular, esos análisis sugieren que el ON afecta los canales parecidos a receptores de rianodina (RYR) (García-Mata *et al.*, 2003; Lamotte *et al.*, 2004 y 2006). Los efectos regulatorios de la aplicación exógena de ON sobre el cierre de los estomas (Neill *et al.*, 2002), la inactivación de los canales de K⁺ (García-Mata *et al.*, 2003), la formación de raíces adventicias (Lanteri *et al.*, 2006), y la expresión de genes *PR1* (Klessig *et al.*, 2000) se reducen parcialmente por antagonistas de canales de Ca²⁺. Complementando lo anterior, los inhibidores de

NOS y atrapadores de ON fueron capaces de reducir el aumento de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ inducido por elicitores de respuesta de defensa (Lamotte *et al.*, 2004) y estrés hiperosmótico (Gould *et al.*, 2003; Lamotte *et al.*, 2006).

Durner *et al.*, (1998) y Klessig *et al.*, (2000) obtuvieron los primeros resultados apoyando la participación de ADP cíclico (cADP) en la modulación de flujos de Ca^{2+} por ON. Ellos mostraron que el cADP media la sobre-regulación de la expresión de genes *PR1* por ON en tabaco. El papel del cADP como un segundo mensajero para movilizar Ca^{2+} disparado por ON se apoya por la demostración que el incremento de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ provocado por ON se reduce por el uso de 8-Br-cADPR, un antagonista de cADP (Lamotte *et al.*, 2006). El GMP cíclico (cGMP) puede ser también un componente de la cascada dirigida por ON que conduce al aumento de $[Ca^{2+}]_{cyt}$, como es sugerido por experimentos usando inhibidores de la sGC (García-Mata *et al.*, 2003).

Además de los nucleótidos cíclicos, estudios recientes demuestran la participación de proteínas cinasas en la señalización por ON, como la cinasa de 48KDa sensible a GSON que se induce por ácido salicílico en hojas y células de tabaco en suspensión, también llamada SIPK y que pertenece a una familia de cinasas activadas por mitógeno MAPK (Klessig *et al.*, 2000). Recientemente, Lanteri *et al.*, (2006) caracterizaron una CDPK de 50KDa regulada por ON en hipocótilos de calabaza. Esto abre la posibilidad de que el ON podría regular la actividad de las proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} (CDPKs) (Figura 10.3).

10.5 Interacción del óxido nítrico con las hormonas vegetales

El ON participa en procesos del crecimiento y desarrollo de la raíz. Se ha observado que tratamientos con auxinas inducen un incremento en la concentración de ON que promueve la formación de raíces adventicias (AR) en explantes de calabaza (Pagnussat *et al.*, 2002). Subsecuentemente, se demostró que la aplicación de auxinas a raíces resulta en la producción localizada de ON durante la formación de raíces laterales (LR) y pelos radiculares (RH), así como también la acumulación

de ON en la punta de la raíz durante respuestas gravitrópicas (Correa-Aragunde *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2005). La formación de LR, AR y RH inducida por auxinas así como las respuestas gravitrópicas fueron inhibidas por la aplicación exógena de un atrapador específico de ON, el cPTIO, sugiriendo una función clave del ON endógeno en regular estos procesos morfológicos. Sin embargo, la aplicación de ON fue capaz de revertir el efecto bloqueador del inhibidor del transporte de auxinas ácido 1-naftil talámico (NPA; Pagnussat *et al.*, 2003; Correa-Aragunde *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2005). Estos resultados sugieren que el ON es una molécula importante que opera cascada abajo en la señalización por auxinas durante el crecimiento y desarrollo de la raíz.

Los estomas son poros epidérmicos de las hojas de las plantas. La regulación del tamaño del poro es crucial para optimizar la absorción de CO_2 y para minimizar la pérdida de H_2O por transpiración. Este proceso está regulado por un par de células especializadas adyacentes llamadas células guardianas. Uno de los primeros análisis vinculando al ON y los movimientos estomáticos, se realizó por García-Mata y Lamatina (2002), en donde observaron que el ON induce el cierre de los estomas, reduce la tasa de transpiración y eleva las respuestas adaptativas de la planta al estrés por sequía, así como también, el cierre de los estomas inducido por ON ocurre de manera dependiente de Ca^{2+} en mono y dicotiledóneas. A partir de esto, una gran cantidad de reportes han confirmado la participación del ON en el funcionamiento de las células guardianas (Neill *et al.*, 2002; Desikan *et al.*, 2002; García-Mata *et al.*, 2003). Como resultado, ahora se sabe que en las células guardianas, el ON endógeno se produce por la nitrato reductasa (NR) (Desikan *et al.*, 2002), y su acumulación depende de la especie vegetal y las condiciones fisiológicas. También se ha demostrado que el ON modula el cierre estomático inducido por ABA, H_2O_2 y UV-B (García-Mata y Lamatina, 2002; Neill *et al.*, 2002; He *et al.*, 2005). Las plantas también responden a citocininas incrementando la biosíntesis de ON en periodos cortos de exposición (Tun *et al.*, 2008). El análisis de mutantes que tienen disminuídos los niveles de ON basal endógeno *Atnoa1* y *nia1/2*, sugiere que en la inducción de la producción de ON por zeatina, la NR tiene un papel importante. Estos resultados

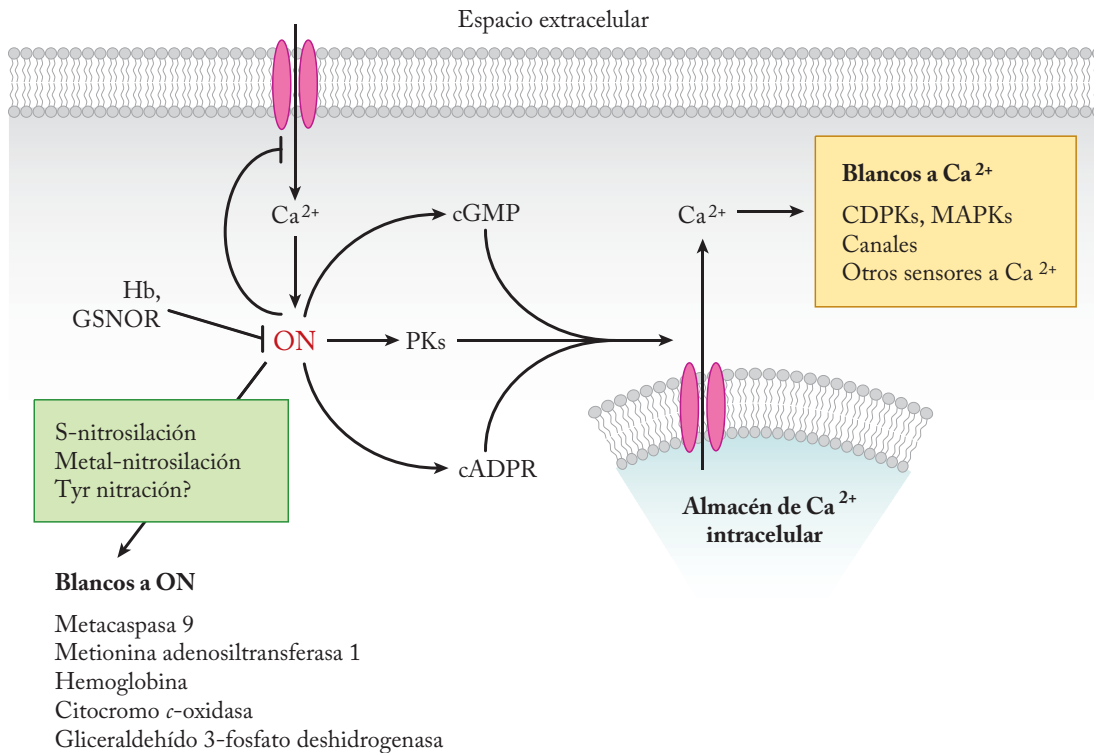


Figura 10.3. Representación esquemática de la señalización del óxido nítrico (ON) en la célula vegetal. El ON produce su efecto a través de varios procesos. Primero, el ON modula la actividad de proteínas blanco mediante la S- y/o metal-nitrosilación. Los substratos bien caracterizados para esas modificaciones post-traduccionales incluyen la metacaspasa 9, metionina adenosiltransferasa 1, hemoglobina (Hb), citocromo c -oxidasa y glicerilaldehído 3-fosfato deshidrogenasa. La Tyr-nitración de proteínas ha sido propuesto como un mecanismo adicional, pero no está demostrado totalmente. Segundo, el ON induce un aumento de la concentración de Ca^{2+} citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) activando canales permeables a Ca^{2+} intracelular que son farmacológicamente relacionados a receptores de rianodina. La regulación de otros canales permeables a Ca^{2+} , incluyendo canales de la membrana plasmática permeables a Ca^{2+} , no son excluidos. Estos procesos involucran ADP ribosa cíclica (cADPR), GMP cíclico (cGMP), proteínas cinasas (PKs) y otros mecanismos basados probablemente en la nitrosilación. La elevación de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ modula la actividad de proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} (CDPKs), proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPKs) y canales sensibles a Ca^{2+} , incluyendo canales de Cl^- y canales de K^+ , reportados en células guardianas (Modificado de Besson-Bard *et al.*, 2008).

sugieren que el ON es un importante intermediario en la señalización por diferentes fitohormonas.

10.6 Conclusiones

Hasta la fecha, se ha generado información que muestra una participación importante del ON sobre diversos procesos biológicos en plantas. Una actividad similar a NOS dependiente de L-Arg ha sido cuantificada en plantas, pero aún no se han encontrado los genes que codifican para estas enzimas. Es evidente

la necesidad de investigaciones posteriores para resolver estos enigmas. Hasta hoy, la síntesis regulada de ON en células guardianas por la NR es quizá el proceso fisiológico mejor entendido. Muchas preguntas persisten acerca de cómo se transmite la señalización por ON para producir respuestas biológicas definidas. Sin embargo, el progreso rápido en la identificación de las proteínas que interactúan con ON y de segundos mensajeros están sentando las bases para entender mejor los mecanismos moleculares que median las respuestas a ON (Figura 10.3). Numerosas proteínas son nitrosiladas, lo que puede también conducir a cambios funcionales específicos. Un reto importante

será demostrar convincentemente que la nitrosilación de proteínas es un mecanismo de señalización específico y prevalente, ocurriendo *in vivo* y no simplemente como una vía para el daño de proteínas. La identificación de mutantes de *Arabidopsis thaliana* y el uso de esta planta modelo en la investigación de los procesos regulados por ON abre nuevas posibilidades para el entendimiento de los mecanismos de acción de esta molécula en el reino vegetal y sus interacciones con las hormonas vegetales.

10.7 Referencias

- Barroso J. B., Corpas F. J., Carreras A., Sandalio L. M., Valderrama R. 1999. Localization of nitric oxide synthase in plant peroxisomes. *J. Biol. Chem.* 274:36729–33.
- Beligni M. V., Lamattina L. 2000. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyls elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta.* 210:215–221.
- Besson-Bard A., Pugin A., Wendehenne D. 2008. New Insights into Nitric Oxide Signaling in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:21–39.
- Bethke P. C., Libourel I. G. L., Jones R. L. 2006. Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 57:517–526.
- Bright J., Desikan R., Hancock J. T., Weir I. S., Neill S. J. 2006. ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant J.* 45:113–22.
- Clarke A., Desikan R., Hurst R. D., Hancock J. T., Neill S. J. 2000. NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant J.* 24:667–677.
- Clementi M. 1998. Role of nitric oxide and its intracellular signaling pathways in the control of Ca²⁺ homeostasis. *Biochem. Pharmacol.* 55:713–718.
- Corpas F. J., Barroso J. B., Carreras A., Valderrama R., Palma J. M. 2006. Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta.* 224: 246–54.
- Correa-Aragunde N., Graziano M., Lamattina L. 2004. Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta.* 218: 900–905.
- Correa-Aragunde N., Graziano M., Chevalier C., Lamattina L. 2006. Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. *J. Exp. Bot.* 57: 581–588.
- Crawford M. N., Galli M., Tischner R., Heimer Y. M., Okamoto M., Mack A. 2006. Response to Zemojtel *et al.*: Plant nitric oxide synthase: back to square one. *Trends Plant Sci.* 11: 526–27.
- Cueto M., Hernandez-Perera O., Martin R., Bentura M. L., Rodrigo J. 1996. Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Lett.* 398: 159–64.
- Delledone M., Xia Y., Dixon R. A., Lamb C. 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature.* 394: 585–588.
- Desikan R., Cheung M. K., Bright J., Henson D., Hancock J. T., Neill S. J. 2004. ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *J. Exp. Bot.* 55: 205–12.
- Desikan R., Graffiths R., Hancock J., Neill S. 2002. A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 16314–16318.
- Dordas C., Hasinoff B. B., Igarberdiev A. U., Manch N., Rivoal J., Hill R. D. 2003. Expression of a stress-induced hemoglobin affects NO levels produced by alfalfa root cultures under hypoxic stress. *Plant J.* 35: 763–770.
- Durner J., Wendehenne D., Klessig D. F. 1998. Defense genes induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 126–131.
- García-Mata C., Lamattina L. 2002. Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. *Plant Physiol.* 128: 790–792.
- García-Mata C., Gay R., Sokolovski S., Hills A., Lamattina L., Blatt M. R. 2003. Nitric oxide regulates K⁺ and Cl⁻ channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 11116–11121.
- Goldstein S., Russo A., Samuni A. 2003. Reactions of

- PTIO and carboxy-PTIO with NO, NO₂, and O₂. *J. Biol. Chem.* 278: 50949-50955.
- Gould K. S., Lamotte O., Klinguer A., Pugin A., Wendehenne D. 2003. Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? *Plant Cell Environ.* 26: 1851-1862.
- Guo F. Q., Crawford N. M. 2005. *Arabidopsis* nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant Cell.* 17: 3436-50.
- Guo F. Q., Okamoto M., Crawford N. M. 2003. Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signalling. *Science.* 302:100-3.
- Hanafy K. A., Krumenacker J. S., Murad F. 2001. NO, nitrotyrosine, and cyclicGMP in signal transduction. *Med. Sci. Monit.* 7: 801-19.
- He J., Xu H., She X., Song X., Zhao W. 2005. The role and the interrelationship of hydrogen peroxide and nitric oxide in the UV-B-induced stomatal closure in broad bean. *Funct. Plant Biol.* 32: 237-247.
- He Y., Tang R. H., Hao Y., Stevens R. D., Cook C.W. 2004. Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science.* 305: 1968-71.
- Herold S., Puppo A. 2005. Oxyleghemoglobin scavenges nitrogen monoxide and peroxynitrite: a possible role in functioning nodules? *J. Biol. Inorg. Chem.* 2005 10: 935-945.
- Hu X., Neill S., Tang Z., Cai W. 2005. Nitric oxide mediates gravitropic bending soybean roots. *Plant Physiol.* 137: 663-670.
- Jih P. J., Chen Y.C., Jeng S. T. 2003. Involvement of hydrogen peroxide and nitric oxide in expression of the ipomoelin gene from sweet potato. *Plant Physiol.* 132: 381-389.
- Klessig D. F., Durner J., Noad R., Navarre D. A., Wendehenne D., Kumar D., Zhou J. M., Shah J., Zhang S., Kachroo P., Trifa Y., Pontier D., Lam E., Silva H. 2000. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 8849-8855.
- Kone B. C., Kuncewicz T., Zhang W., Yu Z. Y. 2003. Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 285: 178-90.
- Kumar D., Klessig D. F. 2000. Differential induction of tobacco MAP kinases by the defense signals nitric oxide, salicylic acid, ethylene, and jasmonic acid. *Mol. Plant Microbe Int.* 3: 347-351.
- Lamotte O., Courtois C., Dobrowolska G., Besson A., Pugin A., Wendehenne D. 2006. Mechanisms of nitric oxide-induced increase of free cytosolic Ca²⁺ concentration in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Free Rad. Biol. Med.* 40: 1369-1376.
- Lamotte O., Gould K., Lecourieux D., Sequeira-LeGrand A., Lebrun-Garcia A., Durner J., Pugin A., Wendehenne D. 2004. Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by elicitor cryptogein. *Plant Physiol.* 135: 516-529.
- Lanteri M., Pagnussat G. C., Lamattina L. 2006. Calcium and calcium-dependent protein kinases are involved in nitric oxide- and auxin-induced adventitious root formation in cucumber. *J. Exp. Bot.* 57: 1341-1351.
- Lea U. S., ten Hoopen F., Provan F., Kaiser W. M., Meyer C., Lillo C. 2004. Mutation of the regulatory phosphorylation site of tobacco nitrate reductase results in high nitrite excretion and NO emission from leaf and root tissue. *Planta* 219: 59-65.
- Lin K. T., Xue J. Y., Nomen M., Spur B., Wong P. Y. 1995. Peroxynitrite-induced apoptosis in H1-60 cells. *J. Biol. Chem.* 270: 16487-16490.
- Lindermayr C., Saalbach G., Durner J. 2005. Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 137: 921-930.
- Lindermayr C., Saalbach G., Bahnweg G., Durner J. 2006. Differential inhibition of *Arabidopsis* methionine adenosyltransferase by protein S-nitrosylation. *J. Biol. Chem.* 281: 4285-4291.
- Mathieu C., Moreau S., Frendo P., Puppo A., Davies M. J. 1998. Direct detection of radicals in intact soybean nodules: presence of nitric oxide-leghemoglobin complexes. *Free Rad. Biol. Med.* 24: 1242-1249.
- Morot-Gaudry-Talarmain Y., Rockel P., Moureaux T., Quillere I., Leydecker M. T., Kaiser W. M., Morot-Gaudry J. F. 2002. Nitrite accumulation and nitric oxide emission in relation to cellular signaling in nitrate reductase antisense tobacco. *Planta* 215: 708-715.
- Neill S. J., Desikan R., Clarke A., Hancock J. T. 2002. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol.* 128:

- 13-16.
- Nelson H. J. 1987. The nitric oxide complex of ferrous soybean lipoxygenase-1. *J Biol Chem.* 262: 12137-12142.
- Orozco-Cardenas M. L., Ryan C. A. 2002. Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants. *Plant Physiol.* 130:487-493.
- Pagnussat G. C., Lanteri M. L., Lamattina L. 2003. Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiol.* 132: 1241-1248.
- Pagnussat G. C., Lanteri M. L., Lombardo M. M., Lamattina L. 2004. Nitric oxide mediates the indole-acetic acid activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root formation. *Plant Physiol.* 135: 279-286.
- Pagnussat G. C., Simontacchi M., Puntarulo S., Lamattina L. 2002. Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol.* 129: 954-956.
- Perazzolli M., Dominici P., Romero-Puertas M. C., Zago E., Zeier J., Sonoda M., Lamb C., Delledonne M. 2004. *Arabidopsis* nonsymbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. *Plant Cell* 16: 2785-2794.
- Petersen O. H., Michalack M., Verkhatsky A. 2005. Calcium signaling: past, present and future. *Cell Calcium* 38: 161-169.
- Planchet E., Jagadis Gupta K., Sonoda M., Kaiser W. M. 2005. Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *Plant J.* 41: 732-43.
- Polverari A., Molesini B., Pezzotti M., Buonauro R., Marte M., Delledonne M. 2003. Nitric oxide-mediated transcriptional changes in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Int.* 16: 1094-1105
- Prado A. M., Porterfield D. M., Feijo J. A. 2004. Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. *Development* 131: 2702-2714.
- Rockel P., Strube F., Rockel A., Wildt J., Kaiser W. M. 2002. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *J. Exp. Bot.* 53: 103-10.
- Schmidt H. H. W., Walter U. 1994. NO at work. *Cell.* 78: 919-25.
- Stamler J. S, Lamas S., Fang F. C. 2001. Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell.* 106: 675-83.
- Schopfer F. J., Baker P. R. S., Freeman B. A. 2003. NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? *Trends Biochem. Sci.* 28: 646-654.
- Stohr C., Stremlau S. 2006. Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *J. Exp. Bot.* 57: 463-70.
- Stohr C., Strube F., Marx G., Ullrich W. R., Rockel P. 2001. A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* 212: 835-41.
- Stuehr D. J., Santolini J., Wang Z. Q., Wei C. C., Adak S. 2004. Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. *J. Biol. Chem.* 279: 36167-70.
- Tun N. N., Livaja M., Kieber J. J., Scherer G. F. 2008. Zeatin-induced nitric oxide (NO) biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* mutants of NO biosynthesis and of two-component signaling genes. *New Phytol.* 178: 515-531.
- Vanin A. F., Svistunenko D. A., Mikoyan V. D., Serezhenkov V. A., Fryer M. J. 2004. Endogenous superoxide production and the nitrite/nitrate ratio control the concentration of bioavailable free nitric oxide in leaves. *J. Biol. Chem.* 279: 24100-7.
- Yamasaki H., Cohen M. F. 2006. NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? *Trends Plant Sci.* 11: 522-24.
- Yamasaki H., Sakihama Y. 2000. Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett.* 468: 89-92.
- Zeidler D., Zahringer U., Gerber I., Dubery I., Hartung T. 2004. Innate immunity in *A. thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:15811-16.
- Zemojtel T., Fröhlich A., Palmieri M. C., Kolanczyk M., Mikula I., Wyrwicz L. S., Wanker E. E., Mundlos S., Vingron M., Martasek P., Durner J. 2006. Plant nitric oxide synthase: a never-ending story? *Trends Plant Sci.* 11: 524-25.