



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

“Participación de las vías de señalización del ácido abscísico y el etileno en las respuestas de desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana* a la *N*-decanoil-homoserina lactona”

Tesis que presenta

Q. F. B. Salvador Barrera Ortiz

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Experimental

Director de tesis

D. en C. José López Bucio

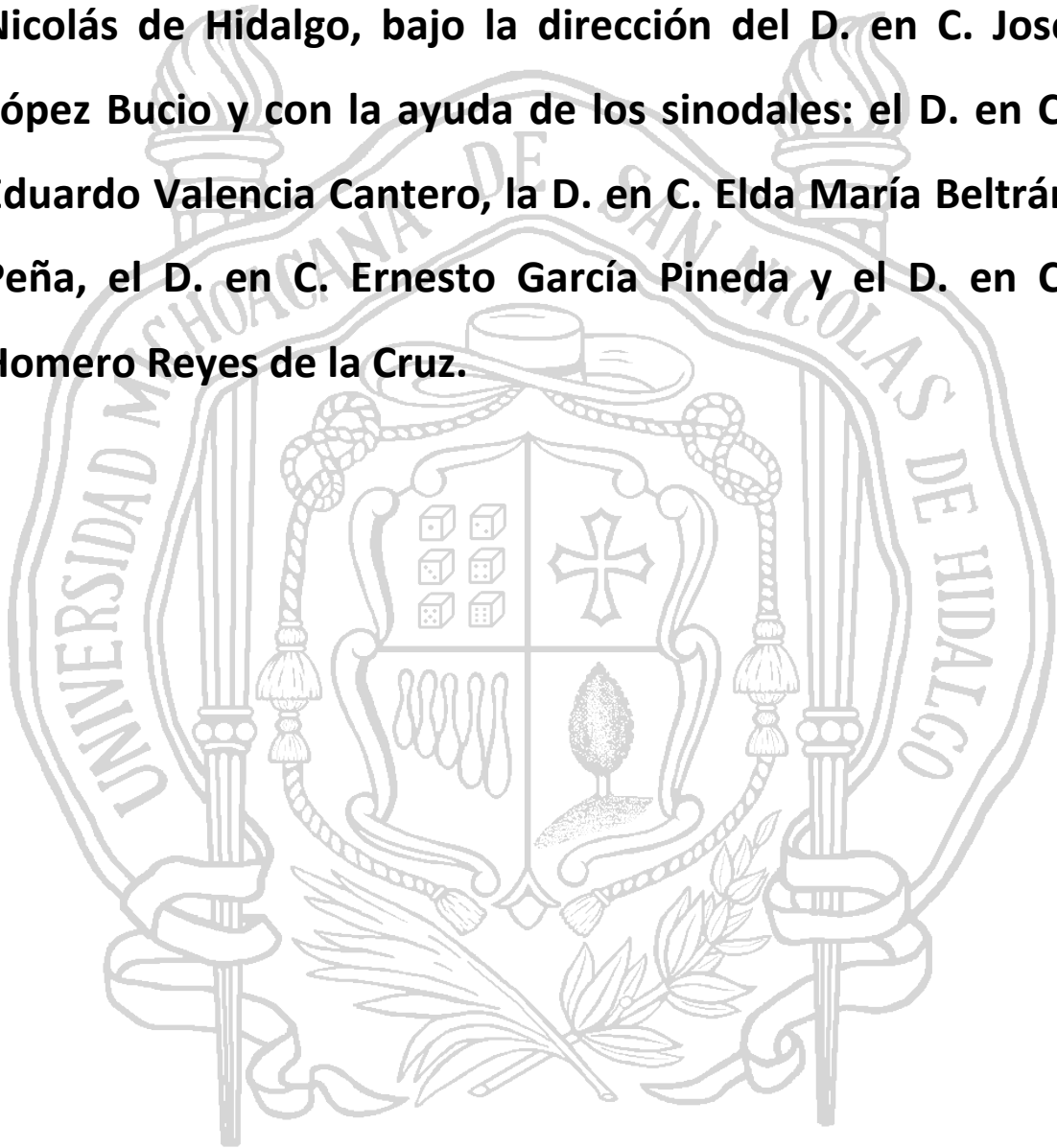
Morelia, Michoacán, Febrero de 2013

IIQB

La adversidad tiene el don de despertar talentos que en la prosperidad hubiesen permanecido dormidos.

Horacio

Este 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. en C. José López Bucio y con la ayuda de los sinodales: el D. en C. Eduardo Valencia Cantero, la D. en C. Elda María Beltrán Peña, el D. en C. Ernesto García Pineda y el D. en C. Homero Reyes de la Cruz.



AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Rosalinda Ortiz Alvarado y Raúl Barrera Ortiz por darme el regalo de la vida, y especialmente a mi madre por su apoyo incondicional y por todas sus enseñanzas.

A mis hermanos, Raúl Barrera Ortiz y Thach Guadalupe Barrera Ortiz por su ayuda para alcanzar este y otros logros, y especialmente a Raúl, que más que un hermano es un padre para mí.

A mi asesor, el D. en C. José López Bucio por dirigir este trabajo y compartirme sus conocimientos, lo cual me ha permitido formarme en esta carrera de la investigación, también por su apoyo y consejos los cuales me sirvieron mucho, y más que nada por haberme aceptado en su grupo de trabajo aun cuando las circunstancias no parecían las más favorables.

A mi compañero y amigo, el M. en C. Randy Ortiz Castro por brindarme su amistad y enseñarme todo lo necesario para trabajar en el laboratorio.

A mis sinodales, el D. en C. Eduardo Valencia Cantero, la D. en C. Elda María Beltrán Peña, el D. en C. Ernesto García Pineda y el D. en C. Homero Reyes de la Cruz por su ayuda para enriquecer y mejorar mi trabajo, en especial a la D. en C. Elda que me ayudó bastante.

Al grupo de trabajo del laboratorio de Bioquímica Ecológica, a la D. en C. Lourdes Iveth Macías Rodríguez, el D. en C. Josué Altamirano Hernández, la Q. F. B. Perla Tzipani García Juárez, la M. en C. Deyanira Castro Sánchez y la M. en C. Xóchitl Paola Pérez Flores por permitirme trabajar en su laboratorio además de ayudarme en mi investigación, y más que nada a Paola y a Perla por ayudarme tanto.

A mis compañeros del Instituto, la M. en C. Amira Garnica Vergara, la L. en B. Edith Muños Parra, la P. L. en B. Guadalupe Jessica Salmerón Barrera, el D. en C. León Francisco Ruiz Herrera, el M. en C. Hexon Ángel Contreras Cornejo, el M. en C. Javier Raya González, el M. en C. Ramón Pelagio Flores, el Q. F. B. Aarón Giovanni Munguía Rodríguez, el M. en C. Enrique Martínez de la Cruz, el L. en B. Alejandro Méndez Bravo, la P. L. en B. Elizabeth García, la Q. F. B. Susana Alejandra Damián, el M. en C. Omar Ortiz, la M. en C. Nancy Aracely Alejandre Ramírez, el M. en C. Rafael Torres Martínez, el I. B. Q. Mauricio Gómez Gallardo, el Q. F. B. Eliseo Estrada, el M. en C. Mauricio Chávez Avilés, el L. en B. Luis Alberto Sánchez Briones, el Q. F. B. Juan Bosco Guzmán Pérez, la M. en C. Blanca Nateras Marín, la Q. F. B. Gabriela María Orozco López, el Q. F. B. Omar González, la I. B. Q. Lorena Farías Rosales, la L. en B. Cristina Prieto Barajas, la L. en B. Claudia García, el L. en B. Ricardo Santillán, el Q. F. B. Ernesto Rodríguez, la M. en C. Idolina Flores Cortez, la D. en C. María del Carmen Orozco Mosqueda y el D. en C. Gustavo Santoyo Pizano por su amistad y toda la ayuda que me brindaron para realizar este trabajo, y en especial a Amira, que espero nuestra amistad perdure.

A mis amigos, Daniel Pizano Corona, P. L. en D. Arturo Ioannis Estrada, Marco Arturo Pizano Corona, Omar Medina, el P. L. en P. E. Ricardo Medina, Tzitziqui, el L. en P. Cuauhtémoc Correa, la Q. F. B. Martha Lizeth Hernández Pahuá, la Q. F. B. Lorena Villalba Sánchez, Miguel Ángel Pizano, la P. L. en P. Patricia Soria, Arturo Pizano Vega, Olivia Pizano Vega, Noé Pizano Vega, Fernando Pizano Vega, Marina Corona, la L. en P. E. Brenda Pizano Corona y Guadalupe Medina por su amistad y toda la ayuda que me brindaron para realizar este trabajo.

¡Y a todos los antes mencionados por aguantarme en el tiempo en que realice este trabajo!

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	4
2. ANTECEDENTES	8
2.1. La raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i>	8
2.2. Moléculas señal: Los reguladores del crecimiento vegetal	11
2.2.1. Ruta de señalización del ABA	13
2.2.2. Vía de señalización del etileno	16
2.2.3. Interacción entre el ABA y el etileno en la regulación de diversos procesos vegetales	21
2.3. Nuevos reguladores del crecimiento vegetal: las amidas <i>N</i> -sustituidas	24
2.3.1. Las alcamidas	25
2.3.2. Las <i>N</i> -acil-etanolaminas	28
2.4. Las <i>N</i> -acil-homoserina lactonas en la interacción planta-microorganismo	31
3. JUSTIFICACIÓN	34
4. HIPÓTESIS	34
5. OBJETIVOS	35
5.1. Objetivo general	35
5.2. Objetivos particulares	35
6. MATERIALES Y MÉTODOS	36
6.1. Material biológico y compuestos bioactivos	36
6.2. Condiciones de crecimiento y análisis de la arquitectura radicular	36
6.3. Análisis histoquímico de la actividad de GUS	37
6.4. Obtención de cruza	38
7. RESULTADOS	39
7.1. Determinación de los rangos de concentración de los tres reguladores	39
7.2. Papel del locus <i>DRR1</i> necesario para la percepción de la C10-HL en las respuestas al ABA y al etileno	43

7.2.1. La mutante <i>drr1</i> es más sensible al ABA que la plántula silvestre	43
7.2.2. La expresión de <i>Abi4:gus</i> es mayor en la mutante <i>drr1</i> en respuesta al ABA que en la plántula silvestre	45
7.2.3. La formación de las raíces laterales inducida por el ACC se encuentra afectada en la mutante <i>drr1</i>	46
7.3. Participación de elementos de la vía de señalización del etileno en las respuestas al ABA y a la C10-HL	47
7.3.1. La mutante <i>etr1</i> es más sensible al ABA que la plántula silvestre	47
7.3.2. La mutante insensible a etileno <i>ein2</i> es hipersensible al ABA	49
7.3.3. Las raíz de la mutante <i>ein3</i> muestra una respuesta al ABA similar a la de la plántula silvestre	50
7.3.4. Resistencia parcial de <i>ein2</i> a la modificación de la arquitectura radicular inducido por la C10-HL	51
7.4. Intervención de la vía de señalización del ABA en las respuestas al etileno y a la C10-HL	53
7.4.1. La expresión de <i>Abi4:gus</i> no se modifica en respuesta al ACC y a la C10-HL en la plántula silvestre	53
7.4.2. La mutante <i>abi5</i> es resistente al ABA pero no muestra diferencias a la plántula silvestre en las respuestas al ACC y a la C10-HL en la raíz	54
8. DISCUSIÓN	57
9. CONCLUSIONES	63
10. REFERENCIAS	64
11. APÉNDICE	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Los reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas	5
Figura 2. La raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i>	9
Figura 3. Etapas del desarrollo durante la formación de las raíces laterales (RL) en <i>Arabidopsis</i>	10
Figura 4. Ruta de señalización citosólica y nuclear del ABA	16
Figura 5. Mutantes de la ruta de transducción de señal del etileno	17
Figura 6. Modelo para la transducción de señal del etileno	21
Figura 7. Sensibilidad incrementada al ABA en el crecimiento de la mutante <i>ein2</i>	23
Figura 8. Las amidas <i>N</i> -sustituidas	25
Figura 9. Escrutinio genético y caracterización fenotípica de la mutante <i>drr1</i>	27
Figura 10. Efectos morfológicos generales de la NAE12:0 sobre la raíz de la plántula silvestre de <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
Figura 11. Sinergismo entre los efectos de la NAE12:0 y el ABA en el crecimiento de la raíz primaria de <i>Arabidopsis</i>	30
Figura 12. Efecto de las <i>N</i> -acil-homoserina lactonas (AHLs) sobre el crecimiento y el desarrollo de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
Figura 13. Efecto del ABA en la arquitectura de la raíz de plántulas silvestres de <i>Arabidopsis thaliana</i>	40
Figura 14. Efecto del precursor de etileno (el ACC) sobre la arquitectura de la raíz de la plántula silvestre y la mutante <i>etr1</i> de <i>A. thaliana</i>	42
Figura 15. Respuesta de la mutante <i>drr1</i> al ABA	44
Figura 16. Expresión del marcador <i>Abi4:gus</i> en la mutante <i>drr1</i> en respuesta al ABA	46
Figura 17. Respuesta de la mutante <i>drr1</i> al precursor del etileno (el ACC)	47
Figura 18. Crecimiento de la mutante <i>etr1</i> en respuesta al ABA	48
Figura 19. Crecimiento de la mutante <i>ein2</i> en respuesta al ABA	50
Figura 20. Crecimiento de la mutante <i>ein3</i> en respuesta al ABA	51

Figura 21. Crecimiento de la mutante <i>ein2</i> en respuesta a la C10-HL	52
Figura 22. Expresión del marcador <i>Abi4:gus</i> en la plántula silvestre de <i>Arabidopsis</i> en respuesta al ACC y a la C10-HL	54
Figura 23. Análisis de la resistencia al efecto del ABA en el crecimiento radicular de las mutantes <i>abi1</i> , <i>abi2</i> , <i>abi3</i> y <i>abi5</i>	55
Figura 24. Efectos del ACC y la C10-HL sobre el crecimiento radicular de la mutante <i>abi5</i>	56
Figura 25. Modelo de la interacción entre la C10-HL, el ABA y el etileno en el crecimiento y el desarrollo radicular de <i>Arabidopsis thaliana</i>	60

RESUMEN

El crecimiento y el desarrollo vegetal están modulados por moléculas conocidas como reguladores del crecimiento o fitohormonas. Anteriormente se planteaba un esquema general, en el que las auxinas, citocininas y brasinoesteroides eran los reguladores maestros del crecimiento, mientras que el ácido abscísico (ABA) y las giberelinas participaban en la germinación de la semilla y que las respuestas de defensa de la planta eran reguladas por el etileno, el ácido salicílico y el ácido jasmónico. Hoy en día se sabe que cada una de las fitohormonas antes mencionadas participa en múltiples procesos, además de que interactúan entre sí. Específicamente la interacción entre el ABA y el etileno parece ser un proceso antagónico, en donde el ABA promueve y el etileno reprime el desarrollo, un ejemplo de tal acción se observa en el proceso de germinación. Recientemente, se han descrito nuevos compuestos bioactivos, como las *N*-acil-etanolaminas (NAEs), las alcanidas y las *N*-acil-L-homoserina lactonas (AHLs), que se encuentran estructural y funcionalmente relacionadas. Tanto las NAEs como las alcanidas son compuestos producidos por las plantas, mientras que las AHLs son sintetizadas por bacterias Gram negativas que colonizan la rizósfera, empleándolas para la comunicación célula-célula mediante un mecanismo de señalización conocido como *quorum-sensing*. En un reporte reciente se mostró la participación de elementos de la vía de señalización del ABA en la respuesta de la raíz de *Arabidopsis thaliana* a las NAEs, abriéndose así la posibilidad de que moléculas estructuralmente relacionadas como las AHLs, modulen también la arquitectura de la raíz de *A. thaliana* a través de la interacción del ABA y el etileno.

En este trabajo utilizamos una estrategia genética para investigar la interacción entre el ABA, el etileno y el compuesto bacteriano *N*-decanoil-L-homoserina lactona (C10-HL). El ABA tiene la capacidad de inducir el crecimiento de la raíz primaria y las raíces laterales en concentraciones inferiores a 0.25 μ M en tanto que a concentraciones altas como 0.5 o 1 μ M reprime el crecimiento de plántulas silvestres de *Arabidopsis*. Los análisis con la mutante *drr1* (resistente a C10-HL) en respuesta al

ABA mostraron que dicha mutante no presenta respuesta a la inducción del crecimiento radicular promovido por concentraciones bajas del ABA, además se observó una mayor sensibilidad a los efectos represores de crecimiento radicular cuando se comparó con la plántula silvestre. Los efectos fisiológicos del ABA en la raíz están relacionados con la expresión del marcador de respuesta al ABA, *Abi4:gus*, el cual se incrementa de manera dependiente de la concentración. En la raíz de la mutante *drr1* existe una mayor expresión del marcador en concentraciones altas de ABA respecto a la plántula silvestre. El ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC; precursor inmediato del etileno en su biosíntesis en plantas) es ampliamente usado para estudiar los efectos del etileno en las plantas que crecen *in vitro* en condiciones de laboratorio. El ACC es capaz de acortar la raíz primaria e inducir la formación de raíces laterales en concentraciones no mayores a 0.4 μ M en la plántula silvestre. En la mutante *drr1* se observó una resistencia a la formación de raíces laterales inducida por el ACC, lo que sugiere que el gen *DRR1* podría regular negativamente la señalización del ABA reprimiendo la expresión del gen *ABI4*, además de ser necesario para la formación de raíces laterales inducidas por el etileno.

Cuando se evaluó la respuesta de tres mutantes insensibles a etileno *etr1*, *ein2* y *ein3* a los efectos del ABA, se observó que *etr1* y *ein2* son más sensibles a los efectos represores del crecimiento radicular, respecto a las plántulas silvestres; en tanto que la mutante *ein3* no mostró diferencias significativas. El hecho de que *ein2* mostrara mayor respuesta al ABA, fue el motivo para analizar las respuestas de dicha mutante sobre la morfogénesis inducida por la C10-HL. En la plántula silvestre la C10-HL es capaz de acortar la raíz primaria e inducir la formación de raíces laterales. La mutante *ein2* fue parcialmente resistente al efecto represor del crecimiento de la raíz primaria y promotor de la formación de las raíces laterales. Estos resultados sugieren que los genes *ETR1* y *EIN2* son reguladores negativos de la señalización del ABA además de que *EIN2* parece ser necesario para la percepción de la C10-HL por las plantas.

Finalmente, analizamos si el precursor de etileno ACC o la C10-HL eran capaces de modificar la expresión del marcador *Abi4:gus* en las plántulas silvestres, los

resultados obtenidos mostraron que las plántulas tratadas con ambos compuestos, presentaron solo diferencias discretas en su expresión respecto a las plántulas crecidas en condiciones control. A la fecha, existen varias mutantes descritas como insensibles al ABA en germinación, debido a que este último es un proceso distinto al del crecimiento radicular, se decidió caracterizar cuáles de estas mutantes eran resistentes a los efectos del ABA en la raíz; por lo que se evaluó el crecimiento de las mutantes *abi1*, *abi2*, *abi3* y *abi5* en presencia del ABA, observando que solo *abi5* mostró resistencia a los efectos represores del crecimiento radicular del ABA en concentraciones superiores a 0.5 μ M. Aunque *abi5* manifestó resistencia al ABA en el crecimiento radicular, no se observaron diferencias significativas respecto a su control en los tratamientos con ACC o C10-HL. Estos resultados proponen que ni el ACC ni la C10-HL son capaces de modificar la expresión del gen *ABI4*, además de que *ABI5* parece ser necesario para que el ABA lleve a cabo su efecto en la raíz y posiblemente no esté implicado en los efectos del etileno y la C10-HL.

En conjunto, los resultados obtenidos en el presente estudio indican que la C10-HL regula el crecimiento de la raíz de *Arabidopsis thaliana* a través de los genes *DRR1* y *EIN2*, los cuales son reguladores positivos de la vía de señalización del etileno y negativos de la ruta del ABA, donde *DRR1* reprime la expresión de *ABI4* en este último proceso.

1. INTRODUCCIÓN

La raíz es importante en las plantas para una amplia variedad de procesos, que incluyen la captación de agua y nutrientes, anclaje y soporte mecánico, funciones de almacén de distintos metabolitos y para la interacción con varios factores bióticos y abióticos. Entender el desarrollo y los factores que afectan la arquitectura de la raíz tiene un enorme potencial para la explotación de los recursos del suelo, incluyendo el agua y los nutrimentos minerales (Smith y De Smet, 2012). La capacidad de las plantas para responder apropiadamente a la disponibilidad de nutrientes es fundamental para su adaptación al ambiente. Nutrimentos como los nitratos, fosfatos, sulfatos y el hierro actúan como señales que pueden ser percibidas por la raíz, activando rutas de señalización que modifican los procesos de división, elongación y diferenciación celular, los cuales tienen un impacto profundo en la morfogénesis. Procesos importantes del desarrollo, tales como la formación de pelos radiculares, el crecimiento de la raíz primaria y la formación de raíces laterales, son particularmente sensibles a cambios en las concentraciones internas y externas de nutrientes. La respuesta del sistema radicular a la disponibilidad de nutrientes, puede modificarse por reguladores del crecimiento vegetal como las auxinas, las citocininas, los brasinoesteroides (BRs), el etileno, el ácido abscísico (ABA), el ácido giberélico (GA), el ácido salicílico (SA) y el ácido jasmónico (JA) (Fig. 1). Lo anterior sugiere que el control nutricional sobre el desarrollo de la raíz puede estar mediado por cambios en la sensibilidad, transporte o síntesis de fitohormonas (López-Bucio *et al.*, 2003).

En general las fitohormonas están presentes en bajas concentraciones en los tejidos de las plantas y actúan localmente, cerca del sitio de síntesis o en tejidos distantes. Colectivamente, estos compuestos regulan cada aspecto de la vida vegetal, desde el patrón de formación durante el desarrollo embrionario hasta respuestas a estrés biótico y abiótico (Santner *et al.*, 2009). Una fitohormona puede regular un conjunto amplio de procesos celulares y morfogenéticos, mientras que al mismo

tiempo múltiples fitohormonas pueden influir en un mismo proceso (Gray, 2004; Suárez-López, 2005).

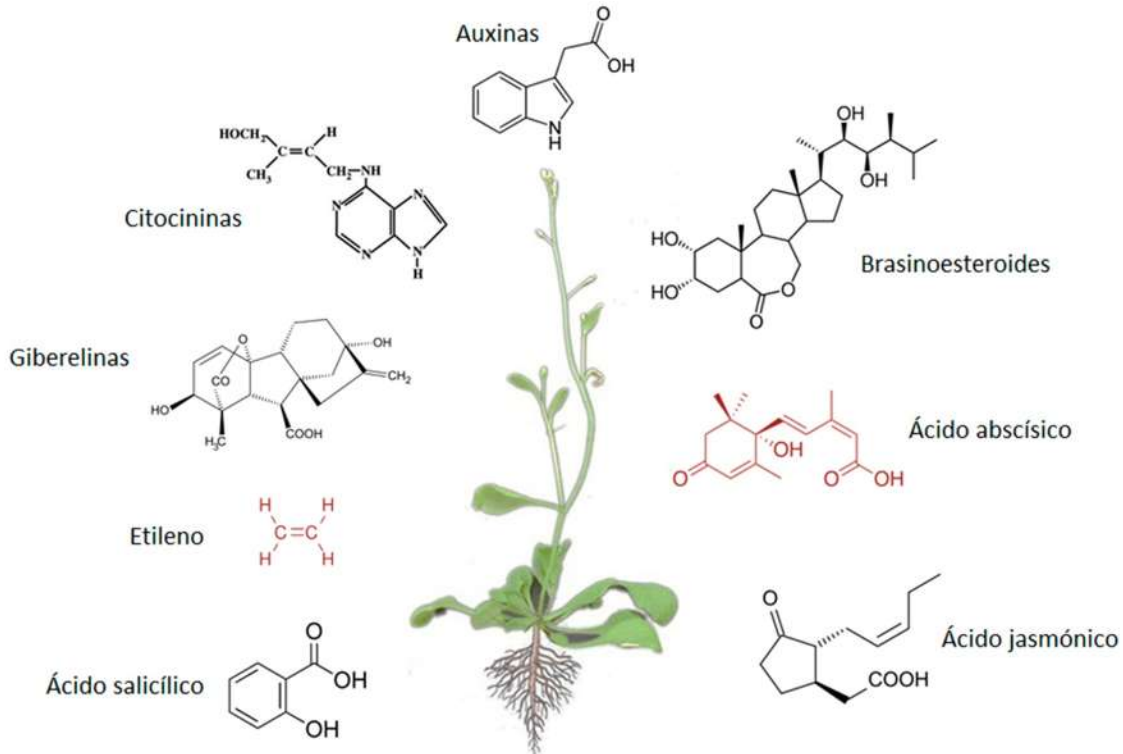


Figura 1. Los reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas. Estructura de las fitohormonas más ampliamente estudiadas.

La acción de las fitohormonas implica la activación de vías de transducción de señales, que comprenden desde la síntesis de la molécula señal (ligando), su transporte, la unión de dicho ligando con su receptor, la activación de segundos mensajeros, la modulación de la transcripción, la inducción de respuestas celulares y la remoción/degradación de la molécula señal. Los receptores pueden estar presentes en la membrana de las células o en el citosol. Usualmente, cuando una molécula señal se une a su receptor, la reacción celular inicial involucra la producción de un segundo mensajero o un mediador de señalización, el cual consecuentemente afecta una serie de procesos celulares. Las sustancias que actúan como segundos mensajero pueden variar en su composición química, incluyendo lípidos, azúcares, iones, nucleótidos, o gases, por ejemplo: Ca²⁺, cAMP, 1,2-diacilglicerol (DAG), 1,4,5-fosfatidil-inositol (IP₃),

óxido nítrico, etc., los cuales pueden actuar sobre diversas clases de proteínas intracelulares (los mediadores de señalización) como cinasas, fosfatasa, fosfolipasas, fosfodiesterasas, etc. Notablemente, algunas de esas moléculas de señalización intracelular son compartidas entre diferentes rutas de señalización y pueden funcionar como puntos de interacción (interferencia) en la comunicación de las redes de señalización dentro de la célula (Wang e Irving, 2011).

Desde hace algún tiempo, los fisiólogos vegetales observaron interacciones aparentemente antagónicas entre algunas de las fitohormonas, como la que ocurre entre las auxinas y las citocininas en la regulación de la diferenciación raíz-brote y entre el ácido giberélico (GA) y el ácido abscísico (ABA) en la germinación. Un ejemplo adicional de la interferencia de señales, se ha reportado entre el ABA y el etileno. Estudios genéticos han demostrado que estos dos compuestos presentan funciones antagónicas en el control del crecimiento y el desarrollo vegetal, incluyendo la germinación y el desarrollo temprano de las plántulas (Beaudoin *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2009; Subbiah y Reddy, 2010). Varios resultados recientes han comenzado a elucidar los detalles moleculares de algunos de estos eventos (Gray, 2004).

En nuestro grupo de trabajo se ha caracterizado un grupo novedoso de moléculas señal entre las que se incluye a las *N*-aciletanolaminas (NAEs) y las alcanidas, dichos compuestos modulan diferentes procesos celulares en los mamíferos mediante su unión a receptores de cannabinoides. Las NAEs y las alcanidas parecen participar en diversos procesos morfogénéticos, incluyendo la germinación de la semilla, la alteración de la arquitectura de la raíz y follaje y la respuesta al ataque por patógenos (Morquecho-Contreras y López-Bucio, 2007). Por otra parte, la búsqueda de compuestos estructuralmente relacionados con las alcanidas en las bacterias, condujo a la identificación de las *N*-acil-homoserina lactonas (AHLs), también conocidos como autoinductores, que son importantes para la comunicación célula a célula. Las AHLs afectan el crecimiento de la raíz primaria, la formación de raíces laterales y el desarrollo de pelos radiculares. En particular, la *N*-decanoil-homoserina lactona (C10-

HL) se tipificó como la AHL más activa por sus efectos sobre la arquitectura del sistema radicular (Ortiz-Castro *et al.*, 2008).

Teaster y col. (2007) presentaron evidencia genética de que una ruta de señalización intacta del ABA es requerida para la acción de las NAEs. Por esta razón, es de interés particular en el presente estudio evaluar si otras moléculas con similitud estructural a las NAEs como lo son las AHLs de bacterias modifican la arquitectura radicular de forma dependiente de la ruta de señalización del ABA y en consecuencia con la vía de señalización del etileno en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

2. ANTECEDENTES

2.1. La raíz de *Arabidopsis thaliana*

La raíz de *Arabidopsis* tiene una estructura simple que consta de varias filas de células que forman a los diferentes tejidos. Dichas filas se originan a partir de cuatro células madre o células iniciales localizadas en el ápice de la raíz (Fig. 2a) (Dolan *et al.*, 1993). Las células iniciales se encuentran rodeando a un número pequeño de células centrales que son mitóticamente inactivas y forman el centro quiescente (QC), el cual participa en la organización de la proliferación celular en torno a las células iniciales para formar i) la epidermis, el tejido más externo de la raíz; la cofia lateral, ii) la columela, junto con la cofia lateral forman el tejido protector del meristemo localizado en la parte más distal de la raíz primaria y de las raíces laterales, iii) la corteza y la endodermis, los tejidos de soporte internos, iv) el periciclo, a partir del cual surgen las raíces laterales; los haces vasculares: xilema y floema que participan en el transporte de agua y fotosintatos, respectivamente (Fig. 2a) (Dolan *et al.*, 1993).

La división de las células iniciales puede ser solamente anticlinal (perpendicular al eje de crecimiento) resultando en una sola fila de células o primero anticlinal y después periclinal (paralelo al eje de crecimiento) resultando en dos o más capas celulares. Las células iniciales de la columela generalmente se dividen solo anticlinalmente y su progenie experimenta una expansión celular rápida y posteriormente ocurren eventos de diferenciación produciendo los amiloplastos, estructuras que contienen almidón y participan en el gravitropismo. Los otros tres tipos de células iniciales experimentan divisiones anticlinales y periclinales, resultando en columnas de células que forman las capas de la raíz (Fig. 2a) (Schiefelbein *et al.*, 1997; Scheres *et al.*, 2002). El sitio en donde las células se encuentran en división celular es conocido como zona meristemática o meristemo de la raíz. La región próxima al meristemo se conoce como zona de elongación, debido a que las células en esta región experimentan una expansión altamente orientada hacia el eje de crecimiento.

Finalmente, las células alcanzan su última etapa de desarrollo en la zona de diferenciación (Fig. 2b) (Dolan *et al.*, 1993; Scheres *et al.*, 2002).

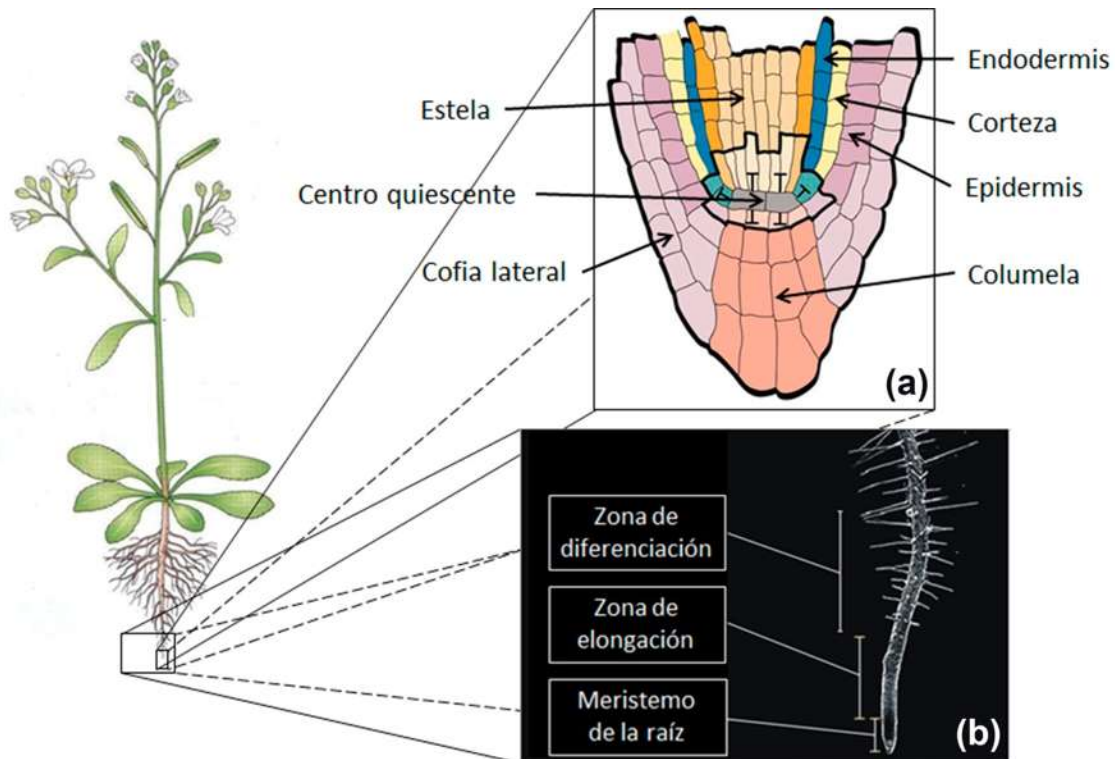


Figura 2. La raíz de *Arabidopsis thaliana*. (a) Tejidos que forman la raíz. (b) Las tres regiones en las que se divide la raíz primaria. Modificado de Scheres *et al.*, 2002.

La ramificación de la raíz es un determinante principal de la arquitectura radicular, ya que provee un mayor anclaje y facilita la captación de agua y nutrientes del suelo. La ramificación de la raíz ocurre post-embrionariamente mediante la formación de las raíces laterales (RLs) a partir del periciclo (Dubrovsky *et al.*, 2000; Dubrovsky *et al.*, 2008). Un primordio de raíz lateral surge a partir de dos células fundadoras del periciclo que se dividen asimétricamente para formar dos células iniciales cortas flanqueadas por dos células más largas que continúan proliferando anticlinalmente. Los primordios se desarrollan y eventualmente emergen de la raíz parental a través de las capas adyacentes de la endodermis, corteza y epidermis. La figura 3 resume las diferentes etapas durante el desarrollo del primordio de la raíz lateral (denominadas etapas I-VII) que finalmente conducen a la emergencia (etapa VIII)

de una estructura nueva y funcional (Casimiro *et al.*, 2003). Por último, el meristemo de la raíz lateral se activa para producir las células requeridas para el crecimiento de una raíz lateral madura que puede producir a su vez nuevas raíces laterales (Malamy y Benfey 1997; Dubrovsky *et al.*, 2006; Swarup *et al.*, 2008). Aspectos clave para la organogénesis de las raíces laterales son la correcta distribución de auxinas formando un gradiente que impacta al periciclo y un mecanismo dependiente de la ruta de señalización de auxinas que coordina los procesos de división y diferenciación celular durante el desarrollo del primordio y la maduración de las raíces laterales (De Smet *et al.*, 2008; De Smet *et al.*, 2010; Marin *et al.*, 2010).

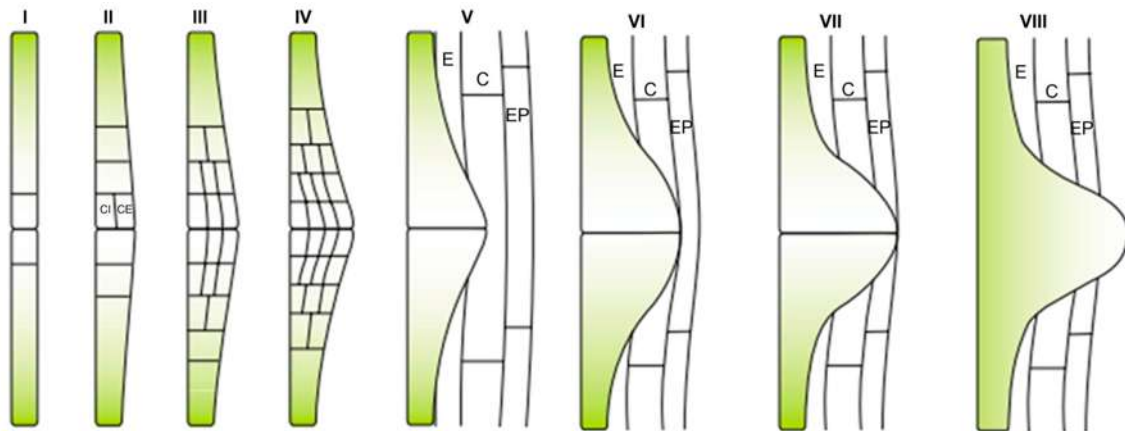


Figura 3. Etapas del desarrollo durante la formación de las raíces laterales (RL) en *Arabidopsis*. Secciones longitudinales de primordios de la raíz lateral (RL) en etapas específicas de desarrollo. El primordio de la RL en etapa I contiene un par de células cortas del periciclo tendidas de extremo a extremo y flanqueadas por dos células más largas. En la II, las células experimentan divisiones anticlinales asimétricas formando una capa interna (CI) y una capa externa (CE). En el primordio de la RL de la etapa III, ocurren divisiones periclinales para crear un primordio de tres capas. En la IV, el primordio de la RL consiste de cuatro capas. En la etapa V, el primordio de la RL se sitúa entre la corteza parental y la epidermis, hasta que finalmente emerge en la etapa VIII. Abreviaciones: CI, capa interna; CE, capa externa; C, corteza; E, endodermis; EP, epidermis. Modificado de Casimiro *et al.*, 2003.

Otro mecanismo por el cual la raíz incrementa su superficie de absorción y adquiere un mayor anclaje al suelo es mediante la formación de los pelos radiculares. Cada pelo radicular es una extensión tubular de una célula epidérmica de la raíz llamada tricoblasto localizada en la región de diferenciación de la raíz primaria (Dolan *et al.*, 1994; Grierson y Schiefelbein, 2002). El desarrollo de los pelos radiculares puede ser dividido en tres fases: la especificación celular, la iniciación y la elongación. La

especificación celular se refiere a la determinación del destino de las células epidérmicas en células que se transformaran en un pelo radicular y aquellas que no lo harán; esto depende de la posición: solo las células epidérmicas sobre dos células corticales se diferencian en pelos radiculares. La iniciación se refiere a la formación de un bulto o protuberancia en el sitio de extensión del pelo. La elongación implica un proceso de crecimiento sostenido, orquestado desde la punta del pelo radicular (Cho y Cosgrove, 2002). En la formación de los pelos radiculares participan varios genes como *ROOT HAIRLESS1 (RHL1)*, *RHL2*, *RHL3* y *CAPRICE (CPC)*, los cuales definen la identidad de las células que se convierten en pelos radiculares (Schneider *et al.*, 1997; Wada *et al.*, 1997). Además, genes como *TRANSPARENT TESTA GLABROUS (TTG)* y *GLABRA2 (GL2)* son necesarios para promover la especificación de las células que no se transforman en pelos radiculares, denominadas atricoblastos (Galway *et al.*, 1994; Massucci *et al.*, 1996). Cabe mencionar que resultados de numerosos experimentos genéticos y farmacológicos indican que el etileno y las auxinas ayudan a promover la diferenciación celular de pelos radiculares y la señalización de estas hormonas ocurre corriente abajo de *TTG* y *GL2* (Masucci y Schiefelbein, 1996; Schiefelbein, 2000; Grierson y Schiefelbein, 2002).

2.2. Moléculas señal: Los reguladores del crecimiento vegetal

Las fitohormonas son moléculas pequeñas derivadas de diferentes rutas metabólicas. Estos compuestos son reguladores importantes del crecimiento vegetal y median las respuestas a estrés biótico y abiótico (Santner *et al.*, 2009). Entre los reguladores del crecimiento vegetal más ampliamente estudiados se encuentran las auxinas, que regulan la división celular, la expansión celular, el flujo iónico, la ramificación de la raíz, el fototropismo, el gravitropismo, la dominancia apical, el desarrollo de los frutos, la partenocarpia y la abscisión. Las funciones principales de las citocininas incluyen la regulación de la división celular, la inducción de la diferenciación de los órganos, el control del movimiento de estomas, el retraso de la degradación de

la clorofila y la atenuación del envejecimiento de la hoja. Los brasinoesteroides afectan la división y la expansión celular, la diferenciación de tejidos, el desarrollo reproductivo y la resistencia al estrés. Las giberelinas estimulan la elongación celular, promueven la floración y liberan la latencia de la semilla. El ABA causa el cierre de estomas previniendo la pérdida de agua por transpiración, promueve el almacenamiento de compuestos, la deshidratación en las últimas etapas de la embriogénesis, así como la maduración y latencia de la semilla. El etileno activa la maduración de los frutos, estimula la germinación, acelera el envejecimiento, modula respuestas de defensa, promueve la elongación de los pelos radiculares, la formación de raíces adventicias y la muerte celular programada en respuesta a patógenos. El ácido jasmónico inhibe la germinación, modula el desarrollo de los óvulos en las flores, participa en las respuestas de defensa por herida y al ataque por herbívoros y patógenos. El ácido salicílico promueve la floración y es un elemento crítico en la inmunidad innata de la planta (Gray, 2004; Santner *et al.*, 2009; Wang e Irving, 2011; Vanstraeten y Benková, 2012). Como se puede apreciar de esta información, múltiples fitohormonas pueden regular un mismo proceso en la planta interactuando entre sí. La actividad de cada hormona vegetal está determinada por su biosíntesis, transporte y metabolismo, así como la eficiencia de los diferentes tejidos para su percepción y transducción de la señal hormonal. La modulación de alguno de estos procesos puede tener un impacto directo sobre la respuesta transcripcional corriente abajo, activando a los genes blanco o modulando la actividad de las proteínas blanco. De acuerdo al nivel en el que las rutas hormonales interactúan, los mecanismos de interacción (interferencia) fueron clasificados en tres tipos designados como interferencia directa (primaria), indirecta (secundaria) y por co-regulación (terciaria) (Chandler, 2009; Kuppusamy *et al.*, 2009). Durante la interferencia directa, las rutas hormonales convergen sobre el mismo blanco y en conjunto controlan la expresión de un gen común o modulan la actividad de la misma proteína. Cuando una hormona o uno de los componentes de la ruta de señalización modula la percepción, sensibilidad o la disponibilidad de otra hormona, la interferencia es indirecta. La co-regulación describe interacciones en las cuales las

hormonas participan en la regulación del mismo proceso pero su contribución es mediada a través de rutas independientes (Chandler, 2009; Kuppusamy *et al.*, 2009).

Como resultado de estas interacciones, la actividad de una hormona en particular puede ser aumentada o suprimida. Si la potencia de salida hormonal es equivalente o excede la suma de las de entrada individuales, la interacción es considerada aditiva o sinérgica respectivamente. En contraste, cuando ocurre una interacción antagónica, la potencia de salida hormonal final es atenuada (Chandler, 2009). Así, las interacciones hormonales generan un nivel adicional de complejidad en la regulación de los procesos del desarrollo y proveen una red para los mecanismos de retroalimentación balanceando atributos clave de los sistemas de desarrollo, su robustez y estabilidad por un lado y su dinamismo y flexibilidad por el otro (Vanstraelen y Benková, 2012). De nuestro particular interés es la interacción que ocurre entre las vías de señalización de las fitohormonas ABA y etileno, entender dicha interacción requiere en primer lugar el conocimiento particular sobre cada una de las vías, el cual se describirá a continuación y posteriormente se abordará el tema de su interacción.

2.2.1. Ruta de señalización del ABA

Hasta el año 2009, todavía no se tenían definidas las proteínas que participan como receptores del ABA. Park y colaboradores (2009), examinaron minuciosamente bibliotecas químicas y observaron que la “pirabactina” funcionaba como un agonista selectivo del ABA. Después de un escrutinio genético utilizando la pirabactina como agente selectivo, se identificó al gen *PYRABACTIN RESISTANCE1* (*PYR1*). Otro grupo de investigadores en un escrutinio de doble híbrido de levadura aislaron una proteína que interactuaba con *ABI1*, a la cual denominaron *REGULATORY COMPONENT ABA RECEPTOR1* (*RCAR1*) (Ma *et al.*, 2009). Posteriormente, en el genoma de *Arabidopsis* se identificó que las *PYR* y *RCAR* corresponden a la misma familia de genes formada por 14 miembros, los cuales se conocen como *PYR1* y parecidos a *PYR1* (*PYL*) 1-13 o *RCAR1-*

RCAR14 (Umezawa *et al.*, 2010). También se reportó que las proteínas PYR-PYL/RCAR podían unirse al ABA e interactuar con las fosfatasa de la familia 2C (PP2C) del grupo A, inhibiendo así la actividad de las PP2C. Los resultados antes mencionados, permitieron sugerir que las PYR-PYLs/RCARs funcionan como una subunidad reguladora negativa de las PP2C (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009). Debido a que las fosfatasa PP2C modulan negativamente la señalización de ABA, se propuso que la unión de la PYR-PYL/RCAR al ABA activaría su vía de señalización. La función de las distintas PYR-PYLs/RCARs se confirmó por la insensibilidad al ABA de la mutante cuádruple *pyr1 pyl1 pyl2 pyl3* (Park *et al.*, 2009) y en forma contrastante, cuando se sobre-expresaron las proteínas RCAR1/PYL9, RCAR3/PYL8 o RCAR8/PYL5 en *Arabidopsis* se produjo una hipersensibilidad al ABA y elevada tolerancia a la sequía (Ma *et al.*, 2009; Santiago *et al.*, 2009; Saavedra *et al.*, 2010).

Por estudios anteriores (a mediados de los 90s), en un escrutinio genético para aislar mutantes de *Arabidopsis* insensibles al ABA, se identificaron dos genes: *ABA-INSENSITIVE1 (ABI1)* y *ABI2*, que codifican para fosfatasa PP2C. Se observó que las mutantes *abi1-1* y *abi2-1* eran insensibles al ABA en varios tejidos y en diferentes etapas de desarrollo, sugiriendo con ello, que las fosfatasa PP2C actúan como reguladores globales de la señalización del ABA (Koornneef *et al.*, 1984; Finkelstein y Somerville, 1990; Leung *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 1994; Leung *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 1998). Recientemente, se determinó que la fosfatasa *abi1-1* es incapaz de interactuar con los receptores PYR-PYLs/RCARs, lo que ocasiona que dichos receptores no puedan inactivar a las fosfatasa que mantienen la vía apagada (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009). La identificación y caracterización de las fosfatasa PP2C ha demostrado la importancia de los eventos de fosforilación en la señalización del ABA, donde varias cinasa han sido aisladas y caracterizadas como componentes de esta vía (Hirayama y Shinozaki, 2007). Entre ellas, existen diez cinasa SnRK2, designadas en *Arabidopsis* como SnRK2.1-SnRK2.10 (Hrabak *et al.*, 2003) o SRK2A-SRK2J (Yoshida *et al.*, 2002). Las cinasa SnRK2s/SRK2s son desfosforiladas eficientemente por las fosfatasa PP2C, por ejemplo ABI1, inactivándolas (Umezawa *et al.*, 2009; Vlad *et al.*,

2009). En este tópico, Vlad y colaboradores (2009) identificaron a la Serina 175 en la cinasa SRK2E/OST1, como el sitio blanco de las fosfatasa, lo cual proporcionó una evidencia fuerte de que dichas enzimas inactivan a las cinasas SRK2. Finalmente, al reconstituir *in vitro* los componentes de la vía, se demostró que los receptores PYR-PYLs/RCARs se unen e inactivan a las PP2C impidiendo la defosforilación de las cinasas SRK2s de una forma dependiente del ABA (Umezawa *et al.*, 2009).

Con relación a las cinasas SnRK2/SRK2, se ha reportado que éstas activan e inactivan canales iónicos de la membrana plasmática, o bien activan factores de transcripción en el núcleo. Por ejemplo, OST1/SRK2E actúa como regulador positivo del cierre de estomas (Mustilli *et al.*, 2002) activando los canales aniónicos SLAC1 e inhibiendo a los catiónicos KAT1 (Geiger *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009). Ambos canales son regulados por la ruta de señalización del ABA y Ca^{2+} (Siegel *et al.*, 2009). Se ha sugerido que la regulación dependiente de Ca^{2+} probablemente se debe a la estimulación de SLAC1 por la cinasa CPK23 (Fig. 4a) (Geiger *et al.*, 2010).

Los reguladores transcripcionales clave en la expresión de genes dependientes de ABA son los ABFs (factores de unión a elementos de respuesta a ABA -ABRE-), del tipo cierre de leucina de región básica (bZIP) con ABI5 como un representante típico (Choi *et al.*, 2005; Finkelstein *et al.*, 2005). La fosforilación de este último por las SnRKs conduce a su activación, mientras que la sumoilación (marcaje de ABI5 con ubiquitina por una SUMO E3 ligasa para su degradación en el proteosoma 26S) antagoniza la acción de ABI5 (Miura *et al.*, 2009). ABI5 y otros ABFs son también fosforilados por las cinasas CPK4 y CPK11 dependientes de Ca^{2+} (Zhu *et al.*, 2007). Otros factores de transcripción que contribuyen a la especificidad del ABA, como el ABI3 (reguladores tipo B3), se unen a ABI5 e incrementan su actividad. Además, ABI4 (factor transcripcional tipo AP2) y factores adicionales que incluyen a las proteínas MYC/MYB actúan también como reguladores positivos de respuesta al ABA (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006). Mutaciones que inducen la pérdida de la función de los factores de transcripción ABI3, ABI4 y ABI5 provocan insensibilidad al ABA durante la germinación (Koornneef *et al.*, 1984; Finkelstein y Somerville, 1990; Finkelstein, 1994). La

heterodimerización de ABI3 con ABI5 y su interacción con la caja ABRE, además de la unión de ABI4 con los elementos ricos en G-C en los promotores de los genes de respuesta a ABA permiten la transcripción óptima de estos genes (Fig. 4b) (Raghavendra *et al.*, 2010).

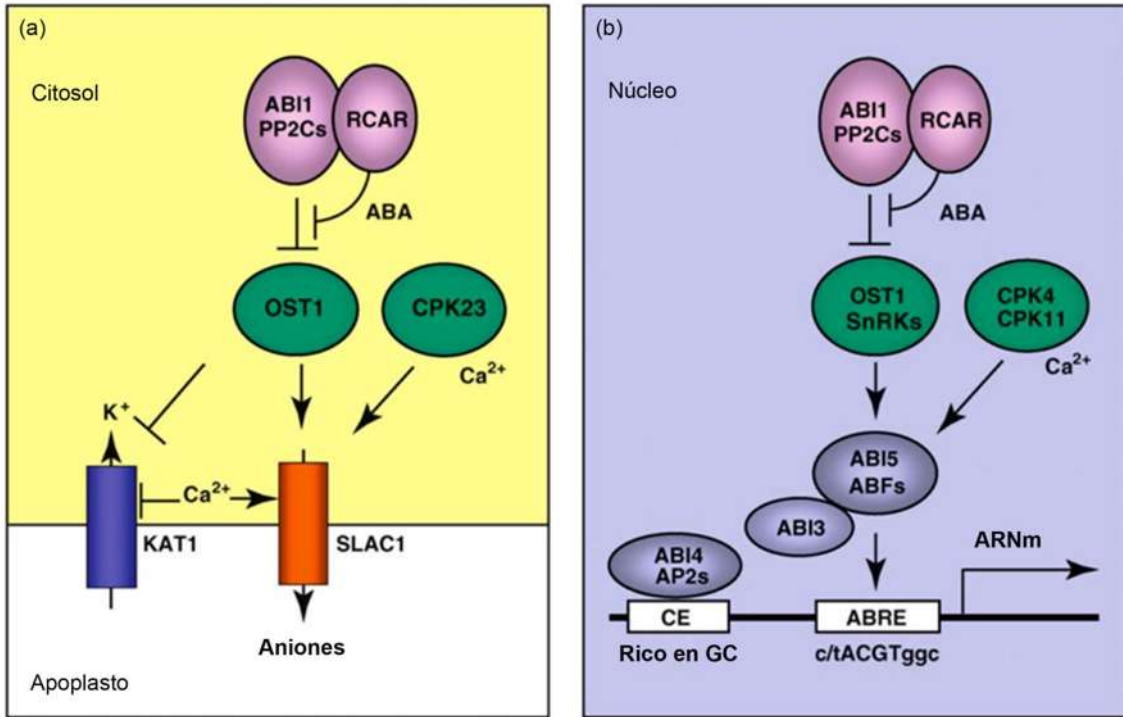


Figura 4. Ruta de señalización citosólica y nuclear del ABA. El receptor de ABA está formado por el complejo heteromérico de una PP2C como ABI1 y un miembro RCAR de unión al ABA. El complejo que forma al receptor controla la señalización de ABA y se encuentra presente tanto en el citosol (a) como en el núcleo (b). La actividad fosfatasa de las PP2C inhibe la acción de las cinasas OST1 y las SnRKs relacionadas y posiblemente de CPKs dependientes de Ca²⁺ como CPK23. En presencia de ABA, la actividad fosfatasa del receptor es bloqueada y las cinasas son liberadas y regulan a los blancos clave de la ruta de señalización de ABA. (a) En las células guarda, los blancos son canales iónicos SLAC1 y KAT1 activados e inhibidos respectivamente por la acción de OST1. (b) En el núcleo los blancos son factores de transcripción tipo cierre de leucina básico ABI5 y ABFs, los cuales al ser fosforilados se unen a los elementos *cis* de respuesta a ABA (ABRE) y en conjunto con otros factores inducen la expresión de genes de respuesta a ABA. ABI3 se une a ABI5 y aumenta su acción, mientras que ABI4 y factores de transcripción tipo AP2 tienen como objetivo un elemento acoplado rico en G-C (CE) para la regulación óptima de la expresión de genes dependientes de ABA. Adaptado de Raghavendra *et al.*, 2010.

2.2.2. Vía de señalización del etileno

Para elucidar la vía de transducción de señal del etileno se requirió del aislamiento de mutantes de los intermediarios que la integran. Cabe mencionar que la

obtención de dichas mutantes en *Arabidopsis*, ha dependido casi exclusivamente del fenotipo en la respuesta triple que se presenta cuando las plántulas mutantes crecen en la oscuridad (Knight *et al.*, 1910). Dicho fenotipo se caracteriza por la presencia de hipocotilos cortos y gruesos, la inhibición del crecimiento radicular y la formación de un gancho apical (Guzmán y Ecker, 1990) que contrasta con el fenotipo etiolado que se caracteriza por un crecimiento preferencial del hipocotilo en la oscuridad, observado en las plántulas silvestres expuestas al aire (Fig. 5).

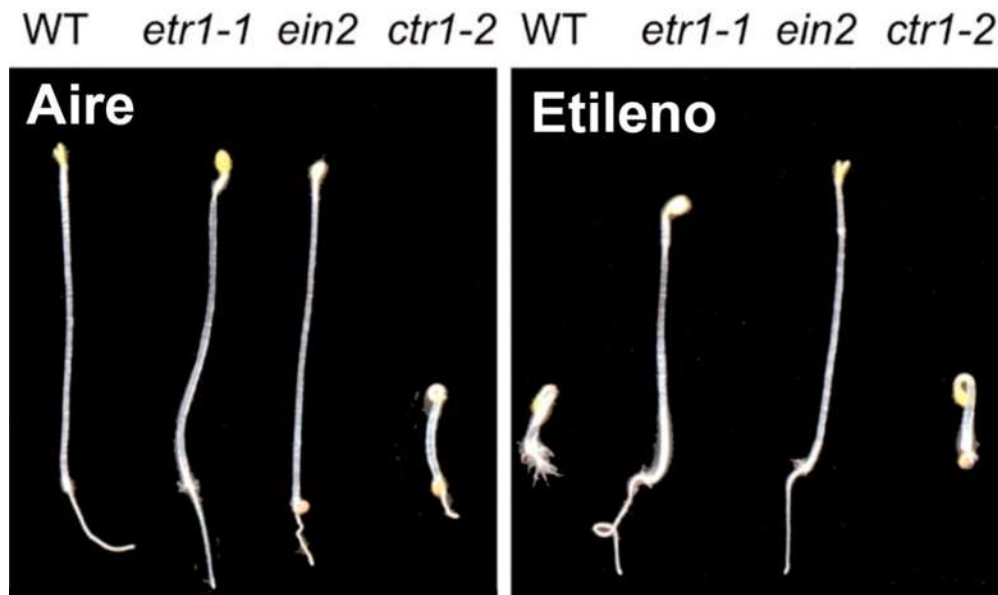


Figura 5. Mutantes de la ruta de transducción de señal del etileno. El efecto del etileno sobre la inducción de la respuesta triple en la oscuridad de la plántula silvestre (Wt) y las mutantes insensibles a etileno *etr1-1* y *ein2*, y la mutante de respuesta constitutiva a etileno *ctr1-2*. Tomado de Schaller y Kieber, 2002.

Las mutaciones aisladas a través del fenotipo alterado en la respuesta al etileno fueron de dos clases: I) insensibles y II) de respuesta constitutiva al etileno. Un ejemplo de las primeras fue la mutante *etr1-1*, que presenta ganancia de la función en un receptor (Bleecker *et al.*, 1988; Chang *et al.*, 1993) y *ein2*, con pérdida de la función en un elemento de la vía de señalización (Guzmán y Ecker, 1990; Alonso *et al.*, 1999). Las mutantes de respuesta constitutiva a etileno mostraron el fenotipo de triple respuesta cuando crecían en aire o en presencia de etileno, un ejemplo de ellas fueron las mutantes *eto3* (*ethylene overproducer3*) con una sobreproducción de etileno (Guzmán

y Ecker, 1990). Alternativamente, también existen mutaciones en la ruta de transducción de señales como la *ctr1* que da como resultado la pérdida de la función del regulador negativo de la vía de señalización manteniendo constitutivamente encendida esta vía (Fig. 5) (Kieber *et al.*, 1993).

La cascada de señalización de etileno descrita hasta la fecha consta de cuatro componentes clave: el receptor ETR1, el regulador negativo de la ruta CTR1, el intermediario EIN2 y el factor de transcripción EIN3. Existen otras proteínas que pueden realizar la misma función debido a su alta homología con los componentes de la ruta de etileno, tal es el caso de ETR2, ERS1, ERS2 y EIN4 que también funcionan como receptores, o EIL1, EIL2, EIL3, EIL4 y EIL5 como factores de transcripción (Fig. 6) (Guo y Ecker, 2004).

ETR1 es una proteína de 738 aminoácidos del retículo endoplásmico que presenta tres dominios transmembranales, que comprenden el sitio de unión a etileno donde al parecer, la unidad funcional de percepción de etileno es un dímero (Schaller *et al.*, 1995). En la activación de dicho receptor se ha comprobado químicamente la actividad histidina cinasa, que implica la autofosforilación de la proteína en un residuo conservado de histidina, con la posterior transferencia de ese grupo fosfato a un residuo de ácido aspártico dentro de un dominio receptor (Gamble *et al.*, 1998). Dicha actividad es típica de sistemas bacterianos de dos componentes, lo que sugiere que podría haberse heredado cuando se llevó a cabo la simbiosis que dio origen a los cloroplastos (Parkinson, 1993). La unión de alta afinidad del etileno está mediada por un cofactor de cobre coordinado por dos aminoácidos conservados (Cis65 e His69) (Schaller y Bleecker, 1995; Rodríguez *et al.*, 1999). La unión del etileno al receptor ETR1 lo inactiva impidiéndole la interacción y activación de la proteína CTR1 (Fig. 6) (Clark *et al.*, 1998).

El gen *CTR1* codifica una proteína de 821 aminoácidos, donde la mitad de la región carboxilo terminal presenta un dominio similar al de las proteínas de la familia Raf de las cinasas serina/treonina que funcionan en las cascadas de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) en animales (Kieber *et al.*, 1993). Las

cascadas MAPK constan de tres tipos de proteínas: la MAPK cinasa cinasa (MAPKKK) que fosforila y activa a la MAPK cinasa (MAPKK), la cual a su vez activa por fosforilación a la MAPK para transmitir la señal fosforilando a su proteína blanco (Ichimura *et al.*, 2000). Se ha sugerido en *Arabidopsis* que CTR1 podría funcionar como una MAPKKK en forma análoga a las Raf, e iniciar la señalización a través de la cascada MAPK lo que culminaría con la inactivación de EIN2 (Novikova *et al.*, 2000; Ouaked *et al.*, 2003). De cualquier modo, no ha sido posible probar la participación de alguna MAPKK o MAPK corriente abajo de CTR1, sino que en lugar de eso, se encontró que la cascada MAPK induce la acumulación de etileno vía la fosforilación de la ACS2 y la ACS6 (dos isoformas de la ACC sintasa) implicadas en la biosíntesis de etileno (Liu y Zhang, 2004). Recientemente, Qiao y col. (2012) mostraron que la inactivación de EIN2 mediante una fosforilación en la Serina 645 requiere de CTR1. También en ese mismo año, otro grupo de investigadores demostró que CTR1 fosforila directamente a EIN2 y que dicha fosforilación puede ocurrir en las serinas 645 y 924, donde esta última juega un papel más prominente reprimiendo la función de EIN2 (Fig. 6) (Ju *et al.*, 2012). Las mutaciones en *CTR1* que afectan su actividad provocan un fenotipo de respuesta constitutiva a etileno, comprobando con ello su papel de regulador negativo de la vía (Kieber *et al.*, 1993).

EIN2 codifica una proteína integral de membrana de 1294 aminoácidos que contiene 12 dominios transmembranales y en la región amino terminal presenta una alta similitud con la familia de transportadores de cationes Nramp (Alonso *et al.*, 1999). La región amino terminal es transmembranal y representa el dominio de entrada, interactuando con factores de señalización corriente arriba (CTR1), en tanto que la porción carboxilo terminal es soluble y citosólica y representa un dominio de salida. Este último dominio, por la acción de una proteasa aún desconocida, es removido de la membrana del retículo cuando EIN2 no es fosforilada por CTR1. Dicho fragmento de la región carboxilo terminal de EIN2 es transportado al núcleo donde interacciona con los factores de señalización corriente abajo (Qiao *et al.*, 2012; Ju *et al.*, 2012). Las mutantes *ein2* exhiben el fenotipo insensible a etileno más fuerte que el resto de las mutantes

insensibles a etileno aisladas en *Arabidopsis*, lo que corrobora su papel crítico en la señalización (Schaller y Kieber, 2002). Aunque EIN2 presenta una alta similitud con la familia de transportadores de cationes Nramp, los experimentos para demostrar la posible actividad de transportador de metales de EIN2 de plantas en sistemas heterólogos, mostraron que EIN2 de *Arabidopsis* fue incapaz de complementar cepas de levaduras deficientes en canales de metales, descartando dicha actividad (Thomine *et al.*, 2000). La acumulación de EIN2 está regulada por el mecanismo de degradación de proteínas mediado por ubiquitinación, donde el complejo SCF^{ETP1/2} marca a EIN2 con ubiquitina para su degradación en el proteosoma 26S (Qiao *et al.*, 2009).

Corriente abajo de EIN2, se ha reportado a la proteína de 628 aminoácidos EIN3 con características de factor de transcripción (Chao *et al.*, 1997). EIN3 se encuentra en el núcleo y presenta dominios ácidos ricos en prolina y glutamina y es miembro de una familia que contiene al menos otros cinco factores de transcripción parecidos a EIN3 (EIN3-like -EILs-) (Chao *et al.*, 1997; Guo y Ecker, 2004), los cuales se unen como homodímeros para promover la transcripción de genes de respuesta a etileno (Solano *et al.*, 1998). Uno de los genes blanco de EIN3 y los EILs es *ERF1* (Solano *et al.*, 1998). Los *ERFs* codifican para factores de transcripción que inducen la expresión de genes relacionados a la patogénesis como la β -1-3-glucanasa, la quitinasa básica y defensinas (Ohme-Takagi y Shinshi, 1995; Solano *et al.*, 1998). De manera similar a lo que ocurre con EIN2, la abundancia de EIN3 y los EILs está regulada por un complejo SCF^{EBF1/2}, el cual promueve la degradación de estos factores de transcripción en el proteosoma 26S (Guo y Ecker, 2003; Potuschak *et al.*, 2003; Gagne *et al.*, 2004). An y col. (2010) mostraron que en las plantas silvestres los niveles de las proteínas EBF1 y EBF2 que forman parte del complejo SCF disminuyen en presencia de etileno con la consecuente acumulación de EIN3 y EIL1, lo cual no ocurre en las mutantes *ein2*, sugiriendo que EIN2 actúa reprimiendo la degradación proteosomal de EIN3 y EIL1 (Fig. 6). Las mutaciones con pérdida de la función para EIN3 presentan un fenotipo insensible a etileno, estableciéndolo como un regulador positivo de la transducción de señales del etileno (Chao *et al.*, 1997).

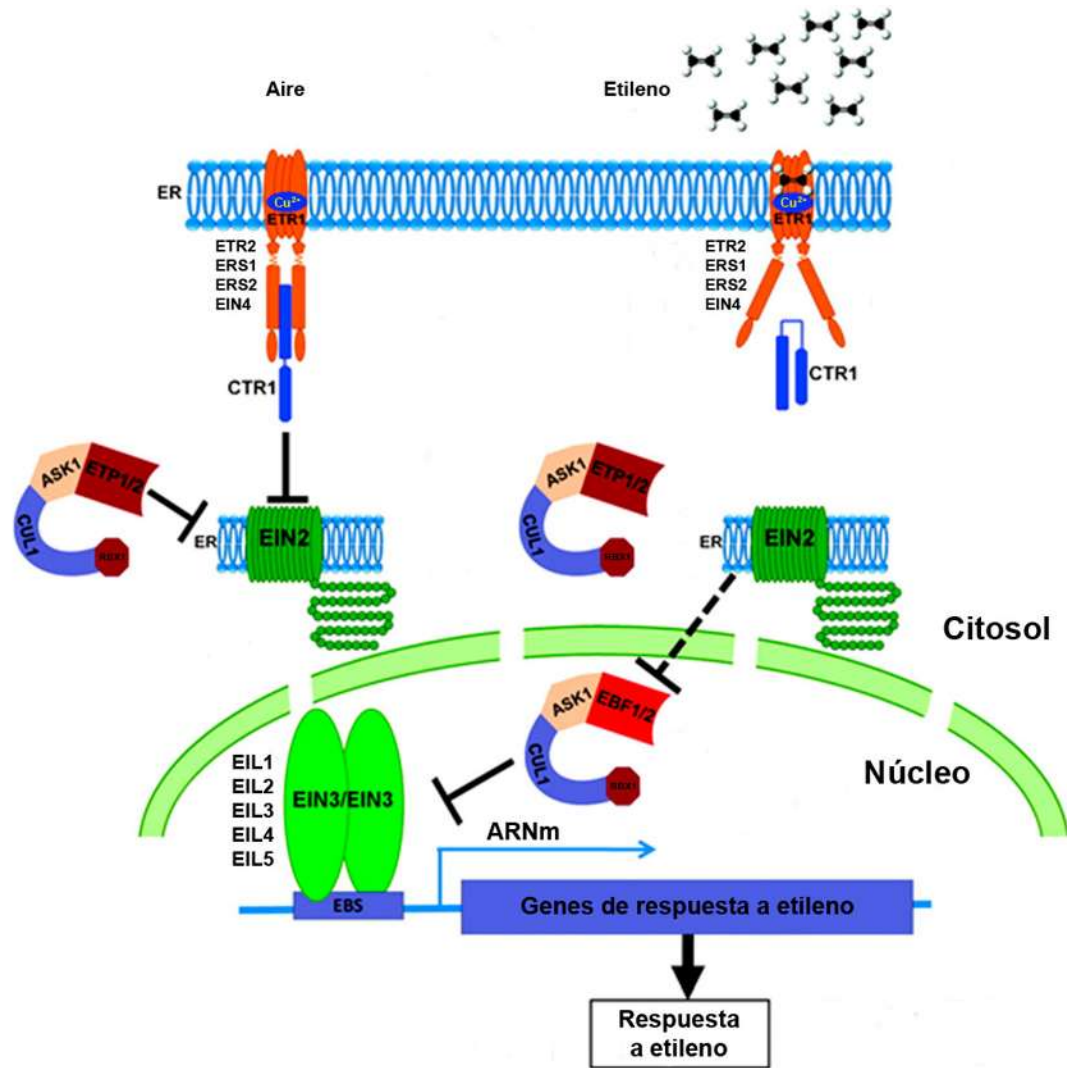


Figura 6. Modelo para la transducción de señal del etileno. En aire, los receptores de etileno mantienen a CTR1 en estado inactivo reprimiendo las respuestas a etileno, mientras que en etileno, la represión es liberada. La unión del etileno inactiva los receptores y por lo tanto a CTR1. Como resultado EIN2 es activado y enciende la cascada que involucra a los factores de transcripción EIN3/EILs que participan en la regulación de las respuestas a etileno, ya que por un mecanismo aún desconocido (indicado por una línea punteada) bloquea la acción del complejo $SCF^{EBF1/2}$ que promueve la degradación de los factores de transcripción al marcarlos con ubiquitina para su degradación por el proteosoma 26S. La abundancia de EIN2 es también regulada por un complejo $SCF^{ETP1/2}$. Modificado de Zhao y Guo, (2011).

2.2.3. Interacción entre el ABA y el etileno en la regulación de diversos procesos vegetales

Es bien conocido que el ABA es un inhibidor de la germinación al promover la latencia de las semillas además de retardar el crecimiento y el desarrollo vegetal, en

tanto que el etileno induce la germinación y el envejecimiento en la planta. El fenotipo inverso de estas dos hormonas en las plantas ha sido caracterizado a distintos niveles. Por ejemplo, existe un reporte donde se muestra que las mutantes *flacca* y *notabillis* deficientes de ABA en tomate, contienen más del doble de etileno que las plantas silvestres (Sharp *et al.*, 2000). Además, el fenotipo de las plantas *flacca* y *notabillis* es de tamaño pequeño, biomasa reducida, tallo corto, hojas pequeñas y formación de raíces adventicias, comparadas con las plantas normales, dichas características son típicas de una respuesta aumentada al etileno. También se observó que el tratamiento de dichas mutantes con tiosulfato de plata (inhibidor de la acción del etileno) restaura parcialmente el crecimiento del follaje. Los datos antes mencionados, sugieren que el efecto causado por la deficiencia de ABA en el follaje puede ser parcialmente atribuido a una sobreproducción de etileno, indicando que además de ser necesario para ejercer sus efectos en la planta de tomate, el ABA es requerido para regular el contenido de etileno (Sharp *et al.*, 2000). Curiosamente, se ha observado que la aplicación del precursor de etileno (el ácido 1-amino-1-ciclopropano [ACC]) no promueve por si solo la germinación, pero si reduce el efecto represor del ABA sobre la germinación en *Arabidopsis*, sugiriendo que el papel del etileno en la germinación es el de bloquear el efecto del ABA y regular así el proceso (Ghassemian *et al.*, 2000). Otra evidencia que refuerza la idea del etileno como un bloqueador del ABA, es lo que ocurre en las plántulas mutantes *eto3* que aumentan la producción de etileno y presentan sensibilidad reducida a ABA durante la germinación (Subbiah y Reddy, 2010).

Análisis bioquímicos y moleculares identificaron a una mutante de *A. thaliana* designada como *enhancer response to ABA3 (era3)*, en la cual se incrementó la sensibilidad a ABA en las semillas y se acumuló ABA, sugiriendo que este gen es un regulador negativo de la biosíntesis de ABA (Ghassemian *et al.*, 2000). Análisis genéticos subsecuentes por el mismo grupo mostraron que *ERA3* representa un nuevo alelo en el locus *ETHYLENE INSENSITIVE2 (EIN2)*. Posterior a esto, se observó que las mutaciones con pérdida de la función del gen *EIN2* incrementan la producción del ABA (Wang *et al.* 2007; Cheng *et al.*, 2009). Además, las mutantes *ein2* son hipersensibles a

los efectos represores del crecimiento del ABA (Fig. 7) (Wang *et al.* 2007). De esta manera, *EIN2* parece intervenir en el mecanismo mediante el cual ocurre el bloqueo del etileno en la síntesis del ABA y consecuentemente en los efectos de este último en la planta.

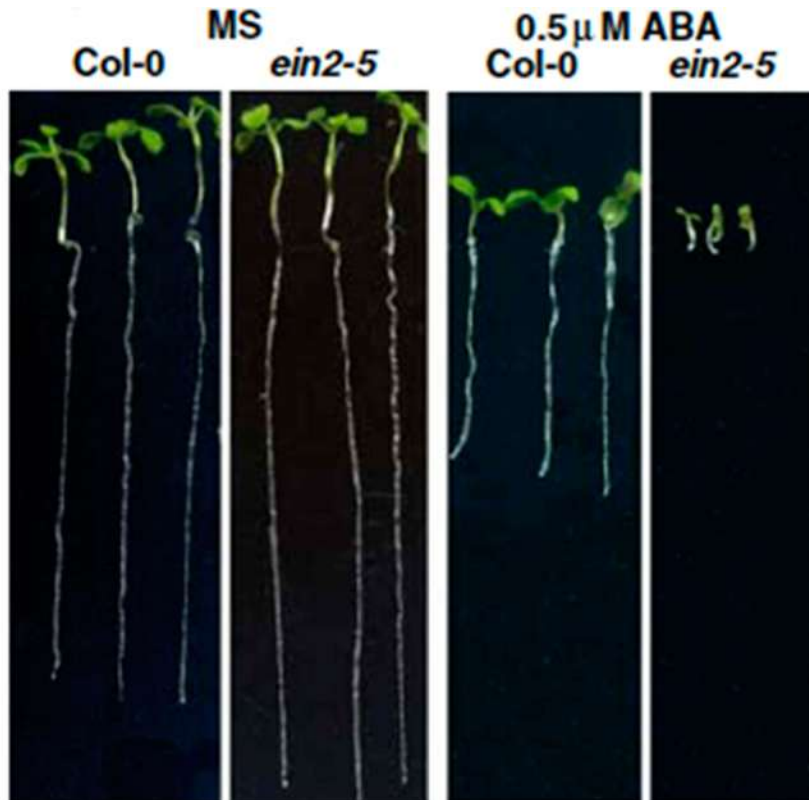


Figura 7. Sensibilidad incrementada al ABA en el crecimiento de la mutante *ein2*. Plántulas silvestres y mutantes *ein2* de diez días de edad en medios control (derecha) y suplementados con 0.5 μ M de ABA (izquierda). Adaptado de Wang *et al.* (2007).

Respecto al efecto de la alteración en ambas vías de señalización, se ha observado que las mutaciones en *CTR1* (inducen una respuesta constitutiva a etileno) y en *EIN2* (provocan insensibilidad a etileno) aumentan o suprimen respectivamente el fenotipo de resistencia a la germinación de la mutante de *Arabidopsis* *abi1* cuando se suplementa con ABA de manera exógena (Beaudoin *et al.*, 2000). Sin embargo, la mutación en *EIN2* no mostró un efecto supresor significativo en las mutantes *abi3* bajo las mismas condiciones (Beaudoin *et al.*, 2000). Lo anterior indica que la cascada de

señalización del etileno, definida por CTR1 y EIN2, inhibe la señalización de ABA, probablemente cascada arriba del factor transcripcional ABI3 en la semilla.

En vista de que mutaciones en la síntesis de ABA alteran las respuestas a etileno y mutaciones en la vía del etileno afectan el contenido de ABA, un análisis de la expresión global de genes por microarreglos mostró que la mutación en *ABA2* (el cual codifica para una enzima implicada en la biosíntesis del ABA) regula positivamente la expresión de los genes que codifican para la enzima de biosíntesis del etileno ACO (ACC oxidasa) y un factor de transcripción de respuesta a etileno ERF053. Mientras que el gen *9-CIS-EPOXICAROTENOID DIOXIGENASE 3 (NCED3)*; codifica para una enzima de la biosíntesis de ABA) fue regulado negativamente en la mutante *ein2*. Además, también se observó que la mutación en el gen *ETR1* disminuye la expresión de los genes *ABSCISIC ACID INSENSITIVE1 (ABI1)* y *CYP70742*, este último implicado en el catabolismo del ABA (Cheng *et al.*, 2009). Los datos antes mencionados sugieren que el ABA y el etileno pueden controlar la biosíntesis, el catabolismo y la señalización hormonal entre ellos, aumentando así sus efectos antagónicos en las plantas. En el presente trabajo, es de nuestro interés determinar el mecanismo de interacción entre el ABA y el etileno en la raíz, debido a la importancia de esta última en el crecimiento y el desarrollo de la planta y particularmente dilucidar la interacción que ocurre entre ambas vías de señalización.

2.3. Nuevos reguladores del crecimiento vegetal: las amidas N-sustituidas

Además de los reguladores del crecimiento antes mencionados (Fig. 1), de los cuales se conocen sus receptores así como varios elementos en sus vías de señalización, recientemente se han descrito nuevos compuestos. Aunque se desconoce el mecanismo mediante el cual dichos compuestos llevan a cabo su señalización, se sabe que son capaces de modificar el crecimiento vegetal y como ocurre con los reguladores clásicos, posiblemente existan elementos de distintas vías de señalización que les permitan su interacción. Las amidas N-sustituidas como las alcamidas y las N-

aciletanolaminas son moléculas de estructura sencilla producidas por las plantas y afectan su desarrollo de manera dependiente de la concentración (Fig. 8) (Morquecho-Contreras y López-Bucio, 2007).

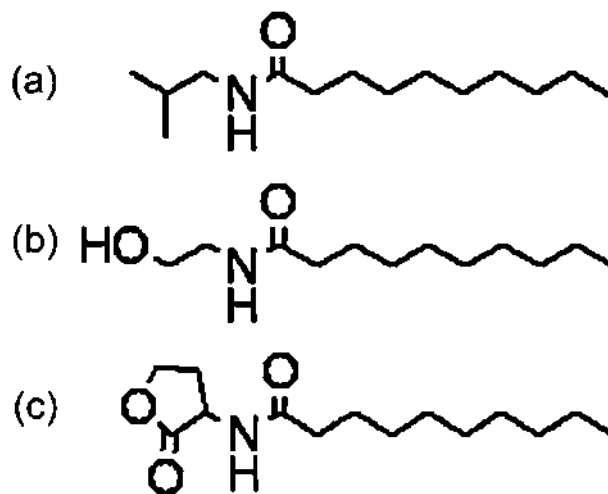


Figura 8. Las amidas N-sustituidas. Estructura química general de (a) las alcamidas, (b) las N-aciletanolaminas y (c) las N-acil-L-homoserina lactonas, todas presentan una cadena hidrocarbonada de 10 carbonos. Modificado de Ortíz-Castro *et al.* (2008).

2.3.1. Las alcamidas

Las alcamidas son amidas N-sustituidas con un grupo isobutilo cuya variabilidad radica en la longitud de su cadena hidrocarbonada (Fig. 8a) y comprenden más de 200 compuestos ampliamente distribuidos en al menos 10 familias de angiospermas que las acumulan en sus tejidos: Aristolochiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Convolvulaceae, Euphorbiaceae, Menispermaceae, Piperaceae, Poaceae, Rutaceae y Solanaceae (Ramírez-Chávez *et al.*, 2004).

El interés en las alcamidas comenzó debido a sus propiedades medicinales, diferentes civilizaciones empleaban especies de plantas que contenían estos compuestos en la medicina tradicional. Los extractos de plantas como *Echinacea angustifolia*, *Echinacea purpurea* y *Heliopsis longipes* son aún utilizados hoy en día en el tratamiento del resfriado común así como en infecciones cutáneas y de las vías respiratorias (Ramírez-Chávez *et al.*, 2004; Raduner *et al.*, 2006). Los efectos

fungitóxicos y bacteriostáticos de la afinina (la principal alcanida producida por la raíz de *Heliopsis longipes*, hasta el 1% del peso seco total) y la actividad bacteriostática de otras dos alcanidas obtenidas por reducción catalítica de la afinina, la *N*-isobutil-2E-decanamida y la *N*-isobutil-decanamida han confirmado algunas de sus propiedades terapéuticas (Molina-Torres *et al.*, 2004).

Los efectos moduladores de las alcanidas sobre el desarrollo han sido reportados en más de una ocasión, por ejemplo, se ha observado que la amidinina, una alcanida no sustituida aislada del actinomiceto *Amycolatopsis sp.*, estimula la producción de biomasa en plántulas de arroz (*Oryza sativa*) (Kanbe *et al.*, 1993). En plántulas de *A. thaliana*, la afinina incrementa el crecimiento de la raíz primaria y la formación de raíces laterales; y sus dos derivados la *N*-isobutil-2E-decanamida y la *N*-isobutil-decanamida promueven la elongación de los pelos radiculares a concentraciones bajas, además del efecto inverso a concentraciones altas (Ramírez-Chávez *et al.*, 2004). Un trabajo posterior indica que la longitud de la cadena hidrocarbonada y la *N*-sustitución en la alcanida juegan un papel crucial en la actividad biológica de la molécula modificando la arquitectura radicular, siendo la *N*-isobutil decanamida el compuesto que mostró mayor actividad en el estudio (López-Bucio *et al.*, 2007). La alta actividad celular proliferativa de la *N*-isobutil decanamida correlacionó con la formación de estructuras parecidas a callos en la raíz primaria, hojas ectópicas a lo largo de los peciolo de las hojas de la roseta y tejido tumoral desorganizado que se origina en la lámina de las hojas. Esta formación ectópica de órganos por el compuesto pone de manifiesto una división celular activa que coincidió con la activación de la ruta de señalización de las citocininas, además de requerir de los receptores de citocininas para llevarse a cabo (López-Bucio *et al.*, 2007).

Para tratar de entender el mecanismo por el cual las alcanidas alteran el crecimiento y el desarrollo vegetal, se llevó a cabo un escrutinio para identificar mutantes de inserción de T-ADN de *Arabidopsis* incapaces de acortar su raíz primaria en respuesta a una concentración alta de *N*-isobutil decanamida (Fig. 9a). Una mutante recesiva resistente a *N*-isobutil decanamida denominada *drr1* (por sus siglas en inglés

decanamide resistant root), fue aislada debido al crecimiento continuo de su raíz primaria y formación de raíces laterales reducida en respuesta al compuesto (Fig. 9b-e) (Morquecho-Contreras *et al.*, 2010). Toda la información anterior indica que las alcanidas son compuestos con actividad biológica tanto en microorganismos como en plantas y que dicha actividad está ligada a la estructura de la molécula, siendo necesario en la planta el locus *DRR1* para que estas moléculas puedan ejercer su efecto.

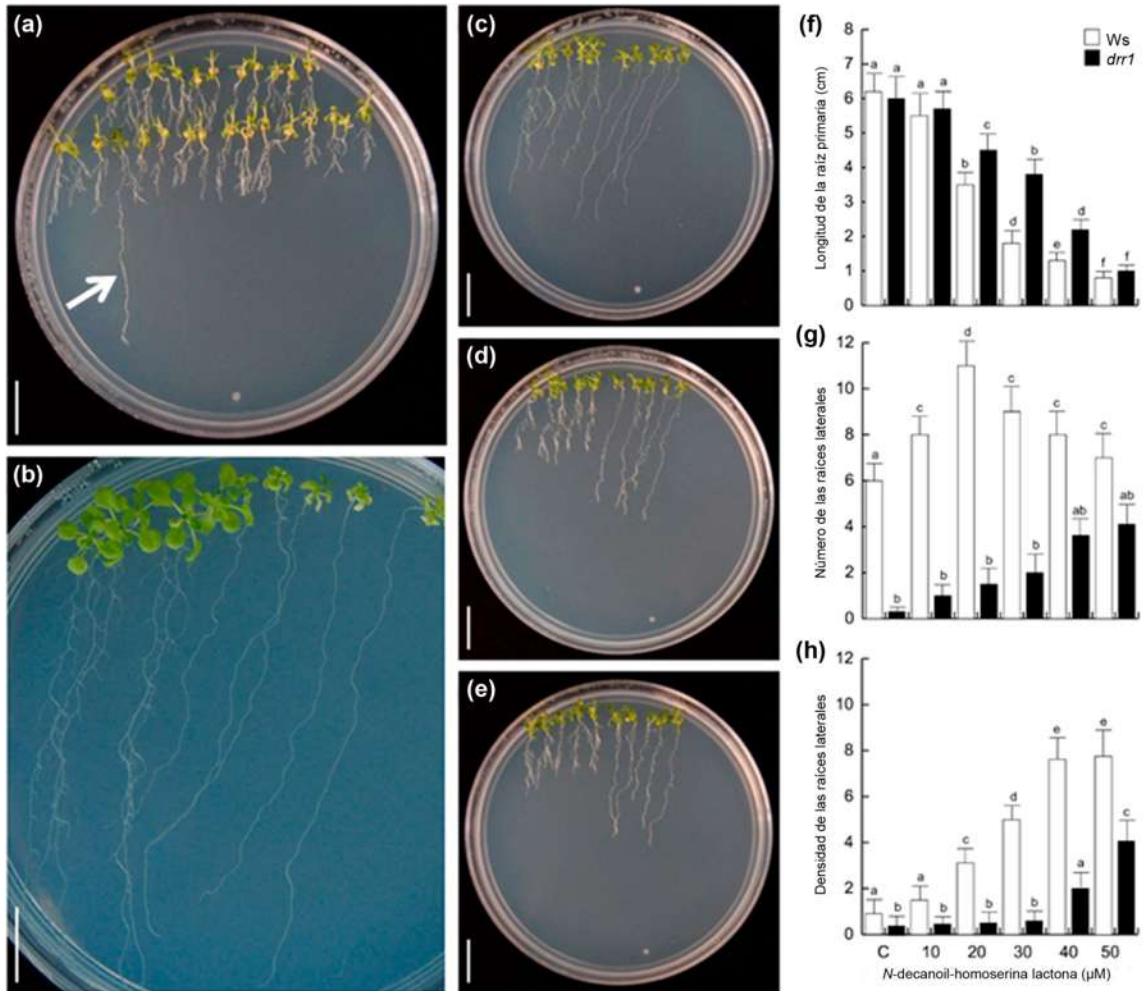


Figura 9. Escrutinio genético y caracterización fenotípica de la mutante *drr1*. (a) Aislamiento de la mutante *drr1* (señalada con una flecha) por su resistencia a la inhibición del crecimiento de la raíz primaria en medios suplementados con decanamida. (b) Crecimiento de plantas silvestres (derecha) y *drr1* (izquierda) en medio control y suplementados con concentraciones crecientes de decanamida (c-e). (f-h) Análisis de la arquitectura radicular de la mutante *drr1* en respuesta a *N*-decanoil-homoserina lactona. Adaptada de Morquecho-Contreras *et al.* (2010).

2.3.2. Las *N*-acil-etanolaminas

Las *N*-aciletanolaminas (NAEs) son metabolitos derivados de la hidrólisis de la *N*-acilfosfatidiletanolamina (NAPE), que es un fosfolípido de la membrana de células animales y vegetales. La enzima que cataliza esta reacción es una fosfolipasa D (PLD) selectiva para NAPEs, la cual presenta baja afinidad para otros fosfolípidos de membrana (De Petrocellis *et al.*, 2004). Al igual que las alcanidas, las NAEs también son amidas *N*-sustituidas las cuales pueden variar en la longitud de su cadena hidrocarbonada, pero a diferencia de las primeras, la *N*-sustitución presenta un grupo etanol conservado y su cadena hidrocarbonada puede contener insaturaciones (Fig. 8b) (Teaster *et al.*, 2007). El metabolismo de las NAEs está conservado entre los organismos eucariontes, sin embargo, las funciones fisiológicas de estos lípidos han sido investigadas principalmente en vertebrados. En los sistemas animales, las NAEs participan como reguladores de procesos fisiológicos importantes como el desarrollo embrionario, la proliferación celular, la respuesta inmune y la apoptosis (Cotter *et al.*, 2011).

En las plantas, las NAEs se encuentran en varios tejidos, donde las moléculas presentan una longitud de la cadena hidrocarbonada que va de los 12 a los 18 átomos de carbono y con cero a tres dobles enlaces. Se ha reportado una alta concentración de NAEs en semillas secas, la cual disminuye una vez que estas germinan (Chapman, 2000). Estudios en *Arabidopsis* mostraron que la *N*-lauriletanolamina (NAE12:0) tiene la capacidad de inhibir la elongación de la raíz (Fig. 10a-c), incrementar el grosor de la punta de la raíz y reducir el número de pelos radiculares de una forma dependiente de la concentración (Fig. 10d-e), actividad que no presentó el ácido láurico (LA), el cual carece del grupo etanolamina presente en todas las NAEs. Los resultados antes mencionados sugieren que la actividad de la NAE12:0 depende de la estructura del compuesto, la cual puede tener un sitio de unión específico en la planta (Blancaflor *et al.*, 2003).

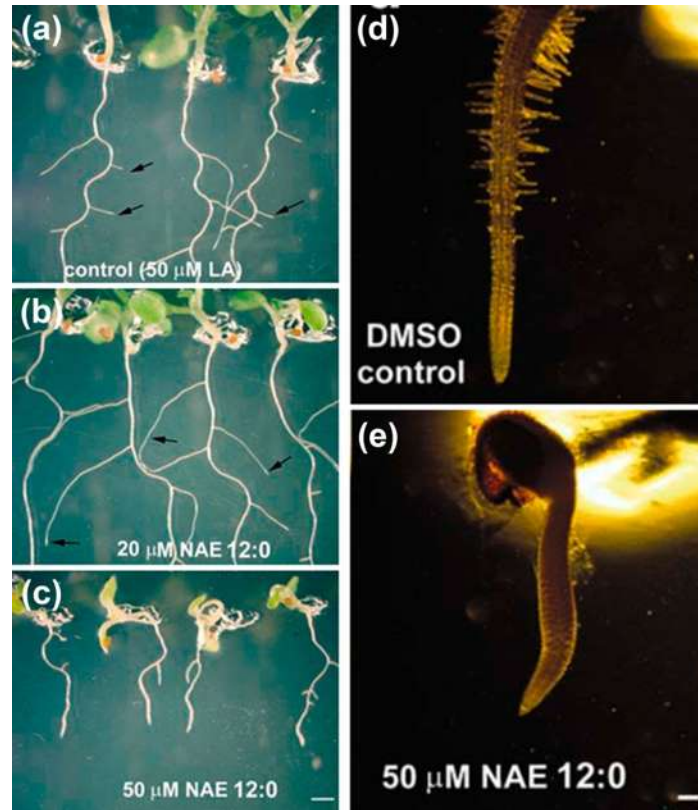


Figura 10. Efectos morfológicos generales de la NAE12:0 sobre la raíz de la plántula silvestre de *Arabidopsis thaliana*. (a) Plántulas de 9 días de edad crecidas en medio control. (b-c) dosis bajas de NAE12:0 (20 μM) incrementan la longitud de las raíces laterales (resaltado con flechas en a y b) e inhiben ligeramente el crecimiento de la raíz primaria, en tanto que concentraciones altas (50 μM) reprimen el crecimiento radicular (c). (d) crecimiento en un medio control de la raíz primaria de una plántula de 3 días de edad presentando pelos radiculares en la zona de diferenciación y (e) otra crecida en un medio con 50 μM de NAE12:0, la cual carece de pelos radiculares, además de tener una menor longitud y un engrosamiento radial de la raíz primaria. Adaptada de Blancaflor *et al.* (2003).

En vertebrados, las NAEs son degradadas por la hidrolasa de amida del ácido graso (Fatty Acid Amide Hydrolase [FAAH]), la cual hidroliza las NAEs a etanolaminas y sus correspondientes ácidos grasos libres. Enfoques bioinformáticos condujeron a la identificación del homólogo de FAAH en plantas capaz de hidrolizar NAEs *in vitro*. Mutantes de inserción de T-ADN de *A. thaliana*, *Atfaah*, muestran niveles elevados de NAEs endógenas y una hipersensibilidad a la inhibición del crecimiento inducido por NAE aplicada exógenamente. Por otra parte, líneas transgénicas sobreexpresoras de FAAH (*OE*), mostraron un contenido de NAE bajo, menor sensibilidad a NAE aplicada exógenamente y mayor tamaño. La información anterior indica que la AtFAAH modula los niveles endógenos de NAEs en las plantas y que la disminución en la concentración

de NAEs probablemente es importante en la regulación del crecimiento vegetal (Wang *et al.*, 2006).

Como se mencionó anteriormente, las NAEs se encuentran en grandes cantidades en las semillas y sus niveles disminuyen drásticamente cuando estas germinan, además de inhibir el crecimiento de plántulas silvestres de *Arabidopsis*. Debido a que el ABA actúa de manera similar en las plantas, se implementó una estrategia genética para determinar si el mecanismo por el cual las NAEs impactan el crecimiento vegetal requería de la vía de señalización del ABA. Como se puede observar en la figura 11, la aplicación combinada de concentraciones micromolares de NAE y ABA producen una reducción dramática del crecimiento de la raíz, que no se presenta cuando se utilizan ambos compuestos por separado. Dicha inhibición del crecimiento se reduce notablemente en las mutantes de la ruta del ABA *abi1*, *abi2*, *abi3* y *abi5*, indicando que la acción de las NAEs requiere de una ruta de señalización del ABA intacta (Teaster *et al.*, 2007).

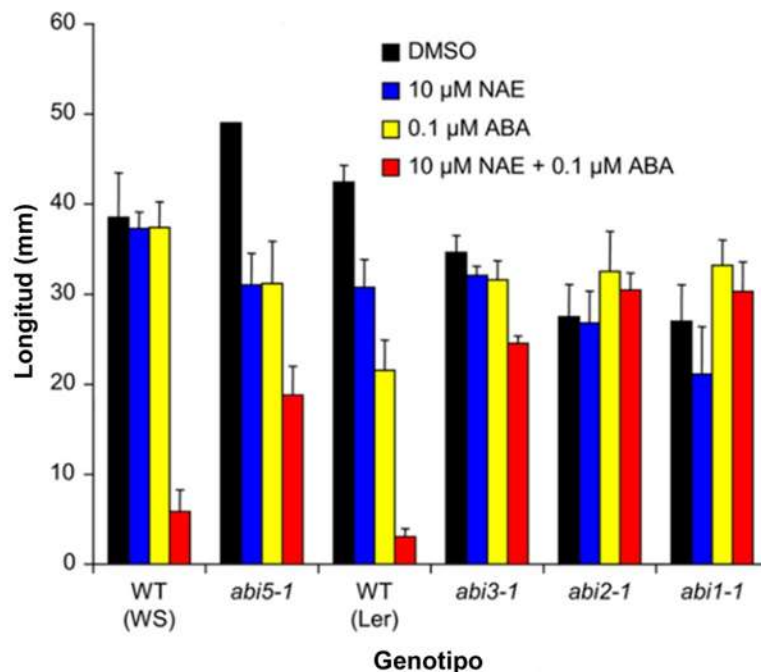


Figura 11. Sinergismo entre los efectos de la NAE12:0 y el ABA en el crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis*. Las mutantes insensibles al ABA (*abi1-1*, *abi2-1*, *abi3-1* y *abi5-1*) no exhiben la inhibición del crecimiento de la raíz por los tratamientos, indicando que la acción de la NAE requiere de una ruta de señalización del ABA intacta. Modificado de Teaster *et al.* (2007).

2.4. Las *N*-acil-homoserina lactonas en la interacción planta-microorganismo

La rizósfera es la zona del suelo influenciada por la raíz, en este sitio se encuentra una gran cantidad de microorganismos los cuales interaccionan con las plantas. La interacción puede ser negativa cuando los microorganismos infectan a la planta causando enfermedad y positiva cuando protegen a la planta y/o promueven su crecimiento (Sharma *et al.*, 2003; Bais *et al.*, 2006). La protección microbiana puede ocurrir por la formación de biopelículas en torno a la raíz, la producción de antibióticos que controlan a especies antagónicas o por la degradación de compuestos tóxicos que son producidos por microbios u otras plantas. La estimulación del crecimiento por microorganismos ocurre cuando estos proporcionan nutrientes que son esenciales para la planta (por ejemplo, la fijación de nitrógeno atmosférico por diferentes tipos de proteobacterias) o por la producción de sustancias que inducen el crecimiento en la planta debido a que impactan en las vías de señalización de los reguladores del crecimiento vegetal. Los compuestos microbianos que inducen el crecimiento vegetal pueden ser los mismos que producen las plantas, por ejemplo las auxinas o citocininas, o moléculas que mimetizan a estos y otros reguladores del crecimiento vegetal debido a que son estructuralmente similares a ellos (Bais *et al.*, 2006; Ortíz-Castro *et al.*, 2009). Un ejemplo de moléculas que mimetizan a los reguladores del crecimiento son las *N*-acil-homoserina lactonas (AHLs) (Fig. 8c) (Sharma *et al.*, 2003; Bauer *et al.*, 2005; Waters y Bassler, 2005).

Las bacterias producen y liberan moléculas señal llamadas autoinductores cuya concentración externa aumenta en función del incremento de la densidad poblacional. Las bacterias detectan la acumulación de una concentración umbral mínima estimuladora de esos autoinductores alterando la expresión de sus genes y por lo tanto su comportamiento. Usando este sistema de señal-respuesta, las bacterias sincronizan comportamientos particulares en una escala poblacional y así funcionan como organismos multicelulares, a este proceso se le conoce como *quorum-sensing* (QS). Las AHLs son un tipo de autoinductores (Waters y Bassler, 2005). En bacterias del género

Pseudomonas como *Pseudomonas aeruginosa*, del 5 al 20% de sus genes y proteínas están regulados directa o indirectamente por QS (Bauer *et al.*, 2005). El hecho de que mutantes de la bacteria *Rhizobium etli* afectadas en síntesis o respuesta a AHLs fueran incapaces de nodular plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y debido a que la nodulación promueve el crecimiento de la planta ya que estas bacterias son capaces de fijar nitrógeno, mostró que el QS participa en interacciones planta-microorganismo benéficas de una manera indirecta (Rosemeyer *et al.*, 1998). Posteriormente, se demostró que raíces de plantas de *Medicago truncatula* expuestas a AHLs modifican la producción de proteínas de la raíz implicadas en la regulación transcripcional, respuestas a hormonas vegetales y del metabolismo primario y secundario, lo cual estableció un papel directo de las AHLs en la interacción planta-microorganismo (Mathesius *et al.*, 2003).

En nuestro grupo, Ortiz-Castro y col. (2008) reportaron que las AHLs tienen la capacidad de alterar el crecimiento y desarrollo de la raíz de *Arabidopsis* y que estas plantas poseen la maquinaria enzimática para metabolizar estos compuestos. La habilidad de inhibir el crecimiento de la raíz primaria e inducir la formación de pelos radiculares está estrechamente relacionada con la longitud de la cadena hidrocarbonada de las AHLs y es dependiente de su concentración, siendo la *N*-decanoil-homoserina lactona (C10-HL) el compuesto que presenta la mayor actividad modificando la raíz de *A. thaliana* (Fig. 12a). La similitud estructural y funcional de la C10-HL con la *N*-isobutil-decanamida de plantas permite hipotetizar que las AHLs son moléculas bacterianas que mimetizan reguladores del crecimiento vegetal ejerciendo su efecto en el crecimiento y el desarrollo.

La similitud funcional de la C10-HL y la *N*-isobutil-decanamida fue evidente en la mutante *drr1*, la cual mostró una respuesta disminuida para percibir el compuesto bacteriano C10-HL, de manera similar a como ocurrió con la alcanamida (Fig. 9f-h) (Morquecho-Contreras *et al.*, 2010). Así que, *drr1* puede ser una herramienta útil para dilucidar el mecanismo por el cual actúan las AHLs en plantas. Cabe mencionar, que la similitud estructural de las AHLs también es compartida con las otras amidas *N*-

sustituidas, las NAEs, las cuales parecen tener efectos opuestos a las AHLs en el crecimiento vegetal, como ocurre en la formación de pelos radiculares (Figs. 10d-e y 12b). Debido a que las NAEs requieren de la vía de señalización del ABA para ejercer su efecto en la planta, es posible que las AHLs interactúen también con esta ruta de señalización hormonal.

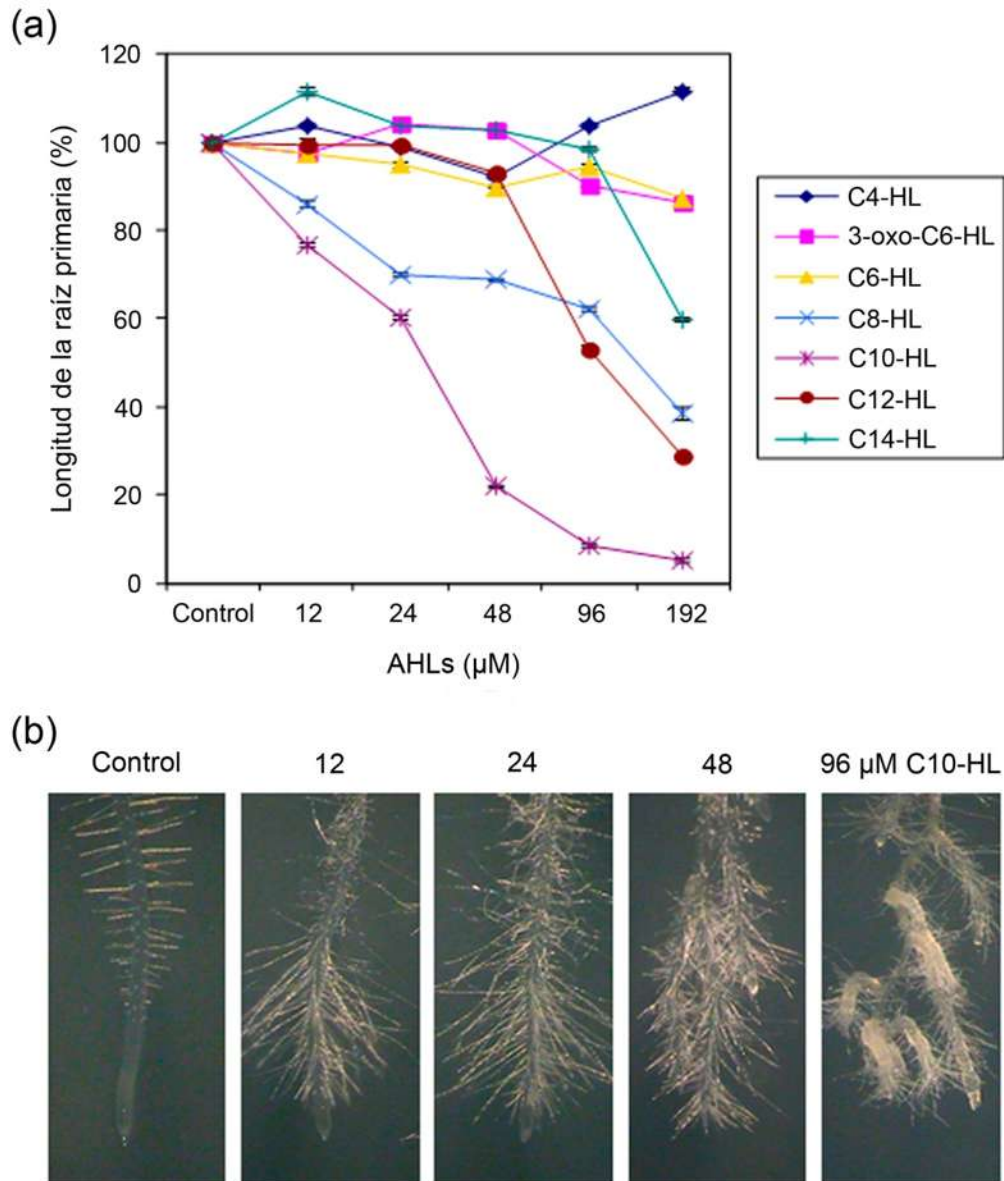


Figura 12. Efecto de las *N*-acil-homoserina lactonas (AHLs) sobre el crecimiento y el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. (a) Porcentaje de inhibición de la raíz primaria (%) de plántulas silvestres tratadas con concentraciones crecientes de *N*-acil-homoserina lactonas (AHLs). (b) Inducción de la formación de pelos radiculares por la AHL más activa, la *N*-decanoil-L-homoserina lactona (C10-HL) en la raíz primaria de plántulas silvestres. Adaptado de Ortíz-Castro *et al.* (2008).

3. JUSTIFICACIÓN

El ácido abscísico (ABA) y el etileno son fitohormonas que interactúan en el control del desarrollo de la raíz a través de mecanismos escasamente estudiados. El efecto de las NAEs sobre la señalización del ácido abscísico abre la posibilidad de que moléculas estructuralmente relacionadas como las AHLs modulen la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis* a través de la interacción ABA-etileno.

4. HIPÓTESIS

Las AHLs regulan la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana* a través de su interacción con algún (os) componente (s) de las cascadas de transducción de señales del etileno y del ácido abscísico.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Caracterizar la participación de las rutas de señalización del ácido abscísico y del etileno en las respuestas de la raíz de *Arabidopsis thaliana* a la *N*-decanoil-homoserina lactona (C10-HL).

5.2. Objetivos particulares

1. Evaluar el papel del locus *DRR1* necesario para la percepción de la C10-HL en las respuestas al ABA y el etileno.
2. Determinar la participación de elementos de la vía de señalización del etileno en las respuestas al ABA y la C10-HL.
3. Caracterizar la intervención de la vía de señalización del ABA en las respuestas al etileno y la C10-HL.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material biológico y compuestos bioactivos

En este trabajo se utilizaron semillas silvestres de *Arabidopsis thaliana* de los ecotipos Columbia (Col-0), Landsberg erecta (Ler) y Wassilewskija (Ws) y las mutantes *drr1* de fondo genético Ws (Morquecho-Contreras *et al.*, 2010); *etr1* (Bleecker *et al.*, 1988), *ein2* (Guzmán y Ecker, 1990) y *ein3* (Chao *et al.*, 1997) de fondo genético Col-0; *abi1*, *abi2* y *abi3* con un fondo genético Ler (Koornneef *et al.*, 1984) y la mutante *abi5* fondo genético Ws (Finkelstein, 1994); también se utilizó la línea transgénica *Abi4:gus* con fondo Col-0, la cual porta un marcador de respuesta ABA (Söderman *et al.*, 2000).

Los compuestos con actividad biológica utilizados en este estudio son la *N*-decanoil-L-homoserina lactona (C10-HL); el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), precursor inmediato del etileno; y el S-(+)-ácido abscísico (ABA), la forma activa de la fitohormona ABA. Los tres compuestos fueron adquiridos en la casa Sigma.

6.2. Condiciones de crecimiento y análisis de la arquitectura radicular

Las semillas fueron desinfectadas con etanol al 95% (v/v) por 5 minutos y cloro al 20% (v/v) por 7 minutos en agitación constante a 1400 rpm. Después de cinco lavados con agua desionizada estéril, el material biológico se incubó por 48 horas a 5 °C. Posteriormente, las semillas fueron germinadas y crecidas en cajas de Petri con un medio de cultivo empleado en nuestro laboratorio para el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* el cual es una versión modificada del medio Murashige y Skoog diseñado para el crecimiento y análisis de cultivos de tejido de tabaco (Murashige y Skoog, 1962). El medio contiene sacarosa al 0.6% siendo la concentración de azúcar que permite un crecimiento óptimo; sales MS al 20% (Sales basales MS, compradas en la casa Sigma) de la concentración sugerida (4.3 g/l) del medio MS original (Murashige y Skoog, 1962), por lo que nos referimos a este medio como MS0.2X (también lo nombramos medio

basal o control); después de un ajuste a pH 7 se agregó fitagar al 1% (Fitagar grado micropropagación, adquirido en la casa Phytechnology) en lugar de Bacto-agar (Difco) para una consistencia sólida. Los compuestos con actividad biológica, el ACC y el ABA fueron disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO, adquirido en la casa Sigma) y la C10-HL en metanol (Metanol anhidro, comprado en la casa Sigma) agregándose al medio en estado líquido (alrededor de 50 °C) a la concentración deseada. Una vez que el medio solidificó, las semillas se sembraron en la superficie del mismo y las placas se colocaron en una cámara de crecimiento para plantas (Percival Scientific AR-95-L) con un fotoperiodo de 16 horas luz, 8 horas oscuridad, una intensidad de luz de $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y una temperatura de 22 °C. Entre los siete y diez días después de la germinación, la raíz primaria de las plántulas se midió con una regla (LRP, longitud de la raíz primaria); el número de raíces laterales (NRL) presentes en la raíz primaria desde el ápice hasta la zona de transición entre la raíz y el tallo se registró con ayuda de un estereoscopio (Leica MZ6) a un aumento de 20X; y la densidad de raíces laterales (DRL) se calculó dividiendo el NRL entre la LRP. Las diferencias entre los datos obtenidos de una misma respuesta (LRP, NRL o DRL) fueron analizadas con el programa Statistica Six Sigma 8.0, mediante pruebas de varianza y significancia Tukey. En las diferentes gráficas, se indica con letras si las medias de los distintos datos difieren significativamente ($p < 0.05$).

6.3. Análisis histoquímico de la actividad de GUS

Las plántulas transgénicas *Abi4:gus* de tres a cinco días de edad fueron incubadas en cajas para microtitulo con X-Gluc al 0.1% (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucoronido) en un amortiguador de fosfatos (NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 al 0.1 M y un pH de 7) con $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ y $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ al 2 mM, durante 12 horas a 37 °C (Jefferson *et al.*, 1987). Una vez retirada la solución de X-Gluc se clareó el tejido con la solución 1 (HCL 0.24 N y metanol al 20% [v/v]) durante 60 minutos a 62 °C, al remover la solución 1 se agregó la solución 2 (NaOH al 7% [m/v] y etanol al 60% [v/v]) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se desechó la solución 2 y el tejido se fijó con tratamientos

de etanol al 40, 20 y 10% (v/v) sucesivamente durante 20 minutos cada uno, desechando el tratamiento anterior y sustituyéndolo por el siguiente. El etanol al 10% se retiró para agregar glicerol al 50% (v/v) (Malamy y Benfey, 1997). Las plántulas en la solución de glicerol fueron observadas al estereoscopio (Leica MZ6) capturando imágenes a un aumento de 20X para el follaje y de 40X para la punta de la raíz. La coloración azul en los tejidos se debe a la actividad de la enzima β -glucoronidasa, cuya expresión está regulada por el promotor del gen *ABI4*.

6.4. Obtención de cruzas

Para movilizar el marcador *Abi4:gus* a la mutante *drr1*, se utilizó el polen de la planta transgénica para fertilizar el gineceo de una de las flores de la planta mutante. La silicua de la crusa fue marcada y posteriormente las semillas de esa silicua fueron desinfectadas y sembradas en un medio de selección (MS0.2X 30 μ M de C10-HL), aquellas plántulas que no presentaron una resistencia a la C10-HL (fenotipo silvestre) fueron crecidas en suelo hasta la obtención de semillas. Estas últimas fueron desinfectadas y sembradas en un segundo medio de selección (MS0.2X 30 μ M de C10-HL) y las plántulas resistentes a la C10-HL (fenotipo mutante) fueron crecidas en suelo hasta la obtención de semillas. Las semillas de cada planta fueron almacenadas por separado y a cada lote se le realizó un análisis histoquímico de la actividad de GUS, aquellos lotes que mostraron la actividad de GUS fueron propagados una vez más para asegurar que las semillas fueran homocigotas en la mutación y en la expresión del transgén (líneas *drr1XAbi4:gus*). Las plántulas que en el primer medio de selección mostraron un fenotipo silvestre fueron aquellas donde la crusa se realizó exitosamente, ya que la mutación es recesiva y solo confiere resistencia a la C10-HL cuando se encuentra en su forma homocigota. En la segunda selección, las plántulas presentaron una segregación mendeliana aproximada de tres plántulas con fenotipo silvestres por una plántula con fenotipo mutante (3.11:0.88), lo cual comprueba que la crusa se llevó a cabo correctamente.

7. RESULTADOS

7.1. Determinación de los rangos de concentración de los tres reguladores

Es bien conocido que el ABA es capaz de inhibir la germinación de las semillas en *Arabidopsis* a una concentración de 3 μM suplementado de manera exógena (Finkelstein y Rock, 2002). Para observar sus efectos sobre la arquitectura radicular, decidimos evaluar concentraciones inferiores a 3 μM . Al realizar un barrido de concentraciones de ABA que van desde 0.1 hasta 1 μM (en intervalos de 0.1 μM), observamos que bajas concentraciones (inferiores a 0.2 μM) promueven ligeramente el crecimiento radicular y que las concentraciones altas presentan una actividad represora (datos no mostrados). A continuación evaluamos un nuevo rango de concentraciones (siendo 1 μM el tratamiento más alto como lo fue en el barrido inicial) que tuvo menos tratamientos y que incluyó las concentraciones bajas y altas, la concentración más baja fue de 0.06 μM y concentraciones sucesivas que eran del doble de la anterior hasta llegar a 1 μM (0.12, 0.25, 0.5 y 1 μM). Los tres ecotipos evaluados (Col-0, Ws y Ler), mostraron diferencias en el crecimiento de la raíz primaria y la formación de raíces laterales en respuesta al ABA, aunque la respuesta al compuesto de los ecotipos Col-0 y Ws parecen ser la más similar respondiendo al compuesto, donde concentraciones inferiores a 0.25 μM de ABA inducen ligeramente el crecimiento de la raíz primaria y por encima de esta se observa una inhibición en dicho crecimiento (Fig. 13a). En el caso de la formación de raíces laterales ocurre algo similar en ambos ecotipos, la densidad de estas estructuras incrementa ligeramente en concentraciones inferiores a 0.5 μM pero es abatida por encima de esta (Fig. 13b-c). El ecotipo Ler no mostró una inducción en la formación de raíces laterales a concentraciones bajas y solo presentó sensibilidad al compuesto a la concentración de 1 μM (Fig. 13b-c). Respecto al crecimiento de la raíz primaria, este fue inhibido de manera dependiente del incremento de la concentración de ABA, sin observar el efecto inductor en este ecotipo (Fig. 13a).

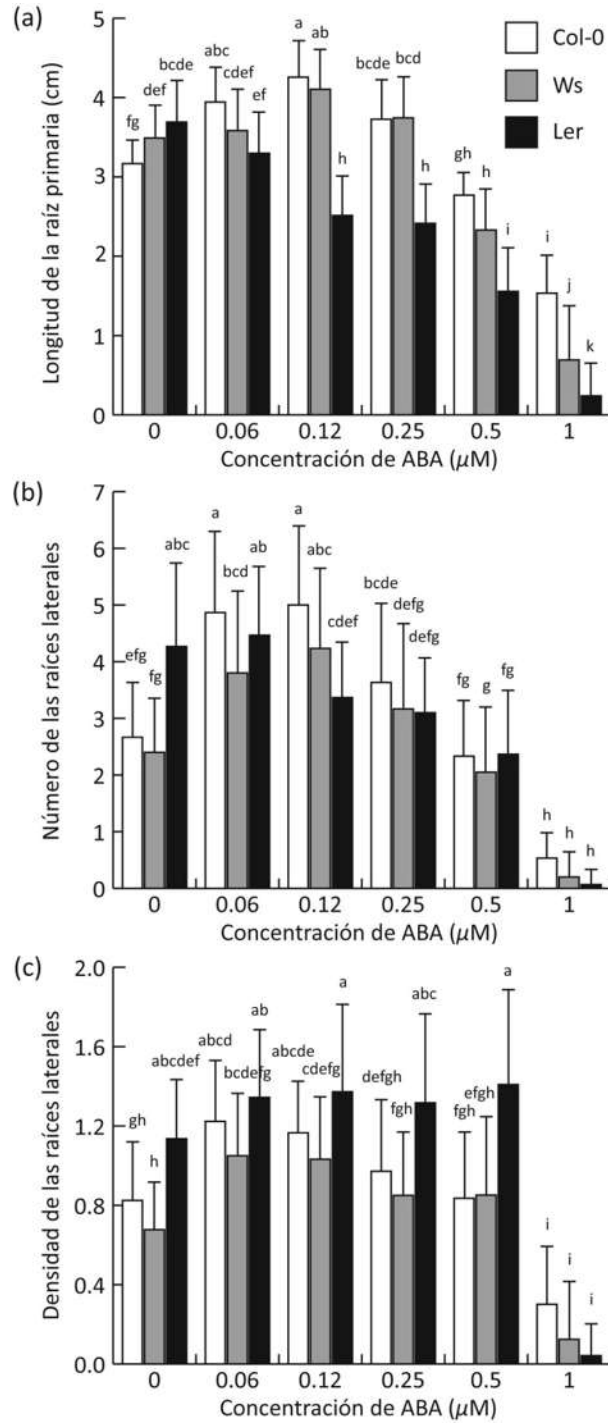


Figura 13. Efecto del ABA en la arquitectura de la raíz de plántulas silvestres de *Arabidopsis thaliana*. Análisis del crecimiento de la raíz primaria (a), la formación de raíces laterales (b) y la densidad de las raíces laterales por centímetro de raíz primaria (c) en los ecotipos Columbia (Col-0), Landsberg erecta (Ler) y Wassilewskija (Ws) de *A. thaliana* a los siete días después de la germinación. El material biológico se creció en placas de Petri sobre medios MS0.2X en condiciones control y suplementados con S-(+)-ácido abscísico (ABA). Los datos indican la media \pm la desviación estándar (n=30). Las letras distintas indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $p < 0.05$. El experimento fue repetido tres veces obteniendo resultados similares.

El análisis de la densidad de las raíces laterales es un dato más adecuado para evaluar las raíces laterales de una plántula, debido a que este parámetro no se ve influenciado por la longitud de la raíz primaria, la cual puede incrementar o disminuir, por lo que en los análisis posteriores se empleará solamente esta evaluación para mostrar el efecto de los compuestos en la formación de las raíces laterales.

Para analizar el efecto del etileno sobre el crecimiento y desarrollo radicular empleamos a su precursor, el ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico (ACC), el cual ha sido ampliamente utilizado para evaluar la función del etileno en varios procesos vegetales. Dicho compuesto ha mostrado que incrementa la acumulación de la fitohormona cuando es suplementado de manera exógena en plántulas silvestres y mutantes de *A. thaliana* (Guzmán y Ecker, 1990). La estrategia utilizada para determinar el rango de concentración del ACC, requirió del uso de una mutante insensible a etileno para saber hasta que concentración la mutante era afectada por el compuesto en los parámetros que decidimos evaluar y como responde la plántula silvestre a los mismos tratamientos. Un barrido de concentraciones del ACC del orden de 0.1 a 0.5 μM , mostró que la plántula silvestre acortan su raíz primaria de una manera dosis dependiente. En la concentración de 0.3 μM se observó una inhibición máxima de alrededor del 60% del crecimiento de la raíz primaria, en tanto que los tratamientos superiores a este no muestran una diferencia estadística significativa (Fig. 14a). Respecto a la formación de raíces laterales, la densidad de estas estructuras incrementa de manera dependiente de la concentración llegando a ser alrededor del doble en la concentración de 0.3 μM , manteniendo una densidad similar las concentraciones siguientes (Fig. 14b). La mutante empleada en este análisis fue *etr1* la cual está afectada en uno de los 5 receptores a etileno y es insensible a esta fitohormona (Bleecker *et al.*, 1988). La mutante fue evaluada bajo el mismo rango de concentraciones de ACC que la plántula silvestre, creciendo lado a lado en la misma caja. Se observó que la mutante *etr1* no mostró diferencias en el crecimiento de la raíz primaria respecto al control cuando crece en los medios suplementados con ACC hasta la concentración de 0.4 μM y solo la concentración de 0.5 μM del compuesto inhibió

ligeramente el crecimiento de la raíz primaria, en tanto que la densidad de las raíces laterales no se afecta en alguna de las concentraciones utilizadas (Fig. 14).

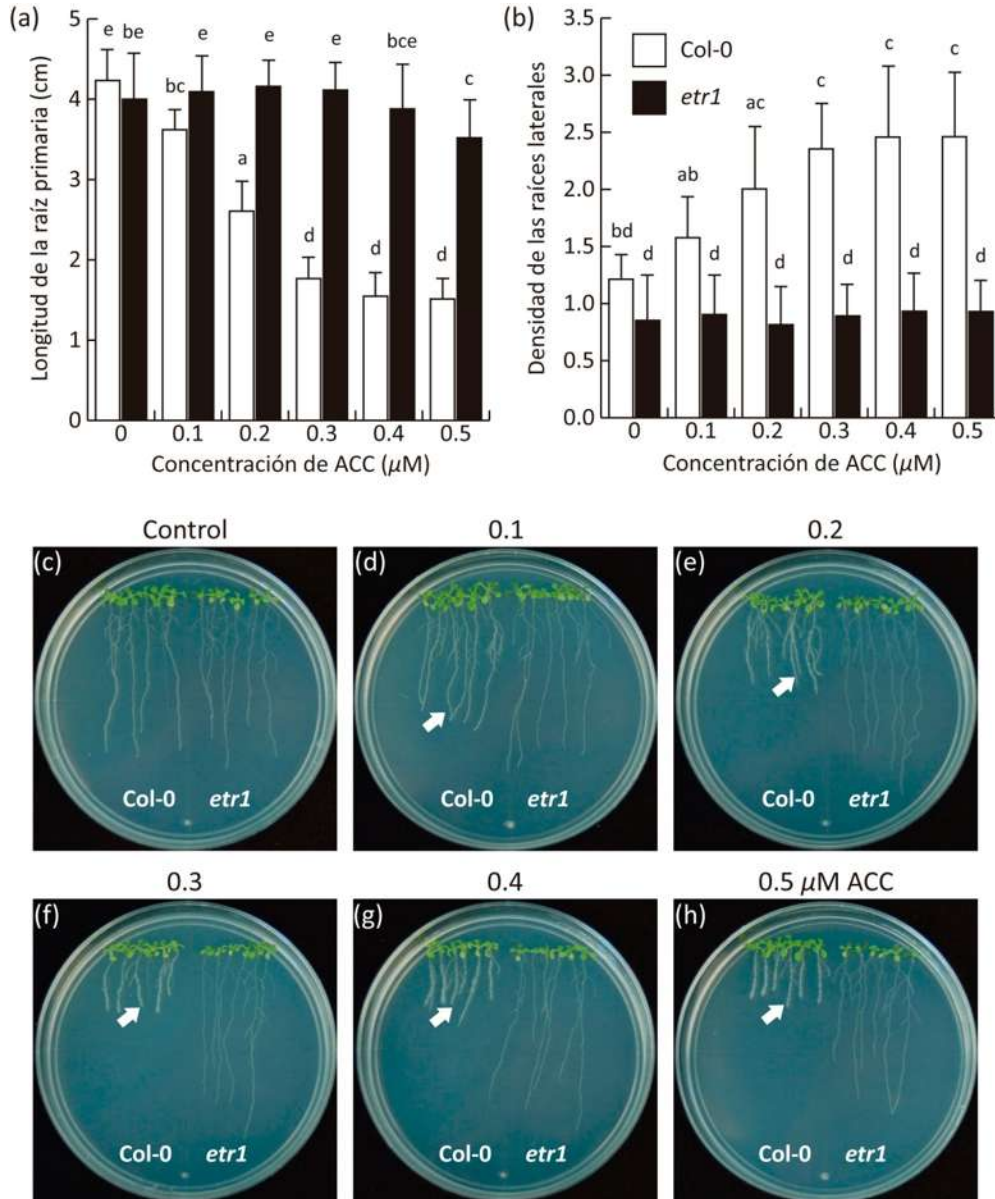


Figura 14. Efecto del precursor de etileno (el ACC) sobre la arquitectura de la raíz de la plántula silvestre y la mutante *etr1* de *A. thaliana*. Crecimiento de la raíz primaria (a) y la formación de raíces laterales (b) del ecotipo Col-0 y la mutante insensible a etileno *etr1* a los diez días después de la germinación. El material biológico se creció en placas de Petri sobre medios MS0.2X en condiciones control y suplementados con ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). (c-h) imágenes representativas del experimento. Las flechas en (d-h) indican el incremento en la formación de pelos radiculares (observado como un engrosamiento de la raíz) en las plántulas silvestres de manera dosis dependiente de la concentración de ACC. Los datos indican la media \pm la desviación estándar ($n=15$). Las letras distintas indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $p < 0.05$. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

Con base en los resultados anteriores decidimos utilizar en los experimentos posteriores un rango de concentraciones de ACC de 0.1 hasta 0.4 μM , ya que bajo estas concentraciones la arquitectura radicular de la plántulas silvestres se altera drásticamente en tanto que la de plántulas insensibles a etileno como *etr1* no muestran cambios significativos. En las imágenes de la figura 14 se puede apreciar que no solo se modifica el crecimiento de la raíz primaria y la formación de raíces laterales en las plántulas silvestres, sino que también el crecimiento y formación de pelos radiculares (observado como un engrosamiento de la raíz) se estimula de manera dependiente de la concentración, una respuesta que es típicamente inducida por etileno, la cual no ocurre en la mutantes *etr1*.

Para el caso del compuesto bacteriano C10-HL, en el trabajo de Morquecho-Contreras y col. (2010) reportaron que la concentración de 30 μM de C10-HL acorta drásticamente la raíz primaria e induce en gran medida la formación de raíces laterales en la planta silvestre (Fig. 9f-h), por lo que tomamos esta concentración como la máxima y disminuimos el intervalo de concentración de 10 a 5 μM para realizar un análisis más fino del efecto del compuesto sobre la arquitectura de la raíz.

7.2. Papel del locus *DRR1* necesario para la percepción de la C10-HL en las respuestas al ABA y al etileno

7.2.1. La mutante *drr1* es más sensible al ABA que la plántula silvestre

Para determinar la participación del locus *DRR1* (necesario para la percepción de la C10-HL) en respuesta al ABA, crecimos a la mutante *drr1* en condiciones control y bajo el rango de concentraciones de ABA previamente descrito, lado a lado con su fondo genético (Ws). En la figura 15a se muestra que la mutante no presenta un crecimiento de la raíz primaria distinto al de las condiciones control en las concentración bajas de ABA y a partir de 0.25 μM muestra una inhibición de dicho crecimiento y concentraciones más altas lo arrestan drásticamente cuando se compara

con la planta silvestre. La mutante también pierde la capacidad de formar raíces laterales desde la concentración de 0.12 μM en tanto que la plántula silvestre lo hace hasta la concentración de 1 μM (Fig. 15b).

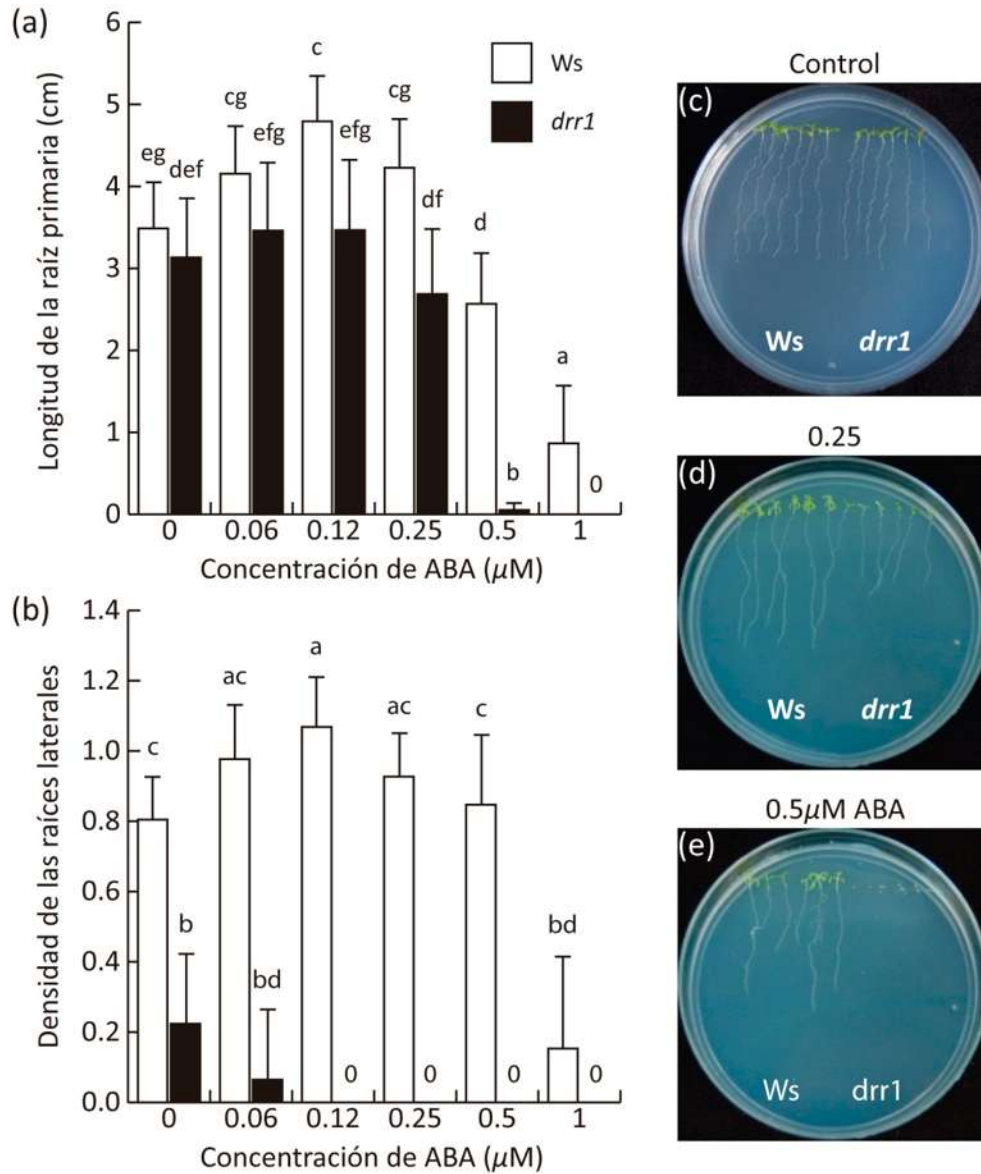


Figura 15. Respuesta de la mutante *drr1* al ABA. Crecimiento de la raíz primaria (a) y la formación de raíces laterales (b) de la mutante *drr1* y la plántula control del ecotipo Wassilewskija (Ws) a los siete días después de la germinación. El material biológico se creció en placas de Petri sobre medios MS0.2X en condiciones control y suplementados con S-(+)-ácido abscísico (ABA). Las imágenes son representativas de las condiciones control (c) y dos de las concentraciones donde se observan los efectos más contrastante del crecimiento de las plántulas silvestres y las mutantes en respuesta al ABA (d-e). Los datos indican la media \pm la desviación estándar (n=15). Las letras distintas indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $p < 0.05$. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

7.2.2. La expresión de *Abi4:gus* es mayor en la mutante *drr1* en respuesta al ABA que en la plántula silvestre

Debido a que la mutante *drr1* presentó una mayor sensibilidad al ABA que la plántula silvestre, evaluamos si esta respuesta estaba relacionada con una mayor expresión de un marcador de respuesta al ABA utilizando la línea transgénica *Abi4:gus* (formada por la región promotora del gen *ABI4* fusionada a la secuencia que codifica para la enzima β -glucuronidasa). El incremento en la intensidad de la coloración azul en los tejidos vegetales es una medida indirecta de la expresión del gen *ABI4*, debido a que la expresión de la enzima responsable de la formación del compuesto colorido está gobernada con el promotor de este gen (Söderman *et al.*, 2000).

En la plántula silvestre, el marcador se expresa en los sitios de división celular y las nervaduras de los cotiledones en el follaje (Figura 16a), en tanto que en la raíz se expresa en la punta, en el centro quiescente y la columela (Figura 16g). Cuando las plántulas se crecieron en medios suplementados con ABA, se observó una mayor expresión del marcador, la cual se extendió en los tejidos del follaje y la raíz de manera gradual conforme incrementó la concentración del compuesto (Fig. 16b-f; Fig. 16h-l). También se pudo observar una inhibición del crecimiento del follaje y la raíz primaria además de un engrosamiento de esta última (como ocurre en presencia de NAE12:0 [Fig. 10d-e]) de manera dependiente de la concentración de ABA (Fig. 16a-l). Por otra parte, en *drr1* (esta mutante fue obtenida mediante una cruce con la línea transgénica *Abi4:gus* y es denominada *drr1xAbi4:gus*) se observó el mismo patrón de expresión de la plántula silvestre en las condiciones control (Fig. 16m,s) pero los tratamientos con ABA estimulan más la expresión del marcador además de que se induce una mayor inhibición del crecimiento del follaje y la raíz primaria con un mayor incremento radial de esta última, lo cual es dependiente de la concentración de la fitohormona (Fig. 16n-r,t-x). En las concentraciones de 0.5 y 1 μ M se observaron los efectos más evidentes (Fig. 16q-r,w-x), que además correlacionan con el fenotipo de mayor sensibilidad de la mutante a la inhibición del crecimiento radicular por el ABA (Fig. 15a).

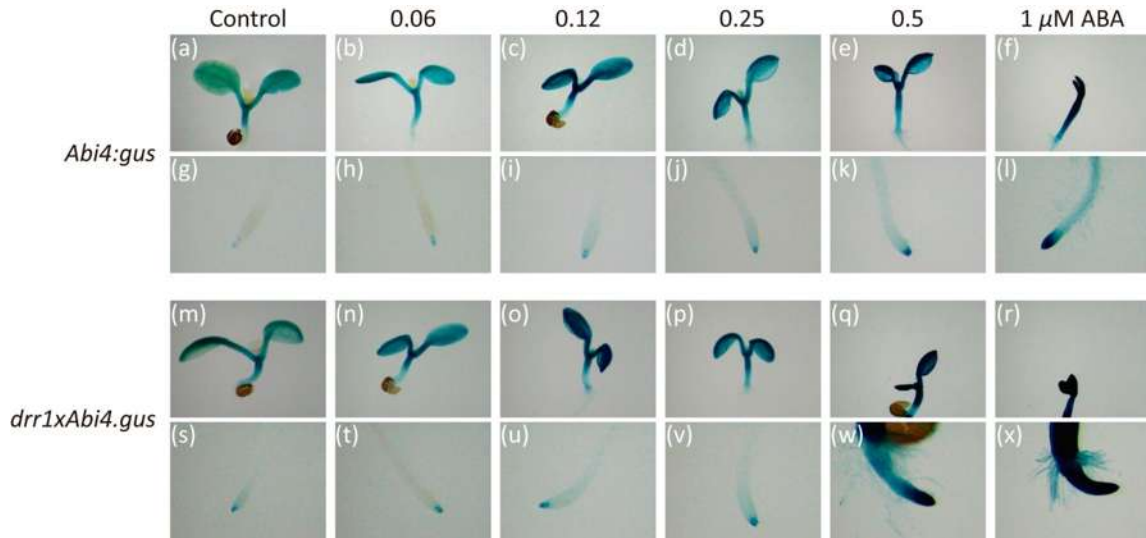


Figura 16. Expresión del marcador *Abi4:gus* en la mutante *drr1* en respuesta al ABA. Plántulas *Abi4:gus* (a-l) y *drr1xAbi4:gus* (m-x) a los 5 días después de la germinación crecidas en cajas de Petri con medios MS0.2X en condiciones control y suplementados con las concentraciones de S-(+)-ácido abscísico (ABA) indicadas. El material biológico fue tratado bajo el protocolo de Jefferson *et al.* (1987) para inducir la actividad β -glucuronidasa y el de Malamy y Benfey (1997) para aclarar el tejido. La coloración azul es indicativo de la expresión del marcador de respuesta al ABA. Las imágenes son representativas de una muestra de 10 plántulas sometidas al mismo tratamiento. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

7.2.3. La formación de las raíces laterales inducida por el ACC se encuentra afectada en la mutante *drr1*

La participación del locus *DRR1* en respuesta al etileno fue determinada creciendo la mutante *drr1* bajo el rango de concentraciones del precursor de etileno ACC, que va desde 0.1 hasta 0.4 μ M. En dicho análisis se observó que de manera similar a como ocurre en la plántula silvestre, la mutante acorta su raíz primaria de manera dosis dependiente de ACC cuando se compara con las condiciones control (Fig. 17a). Para el caso de la formación de raíces laterales en *drr1*, la densidad de estas estructuras no se incrementó como en la plántula silvestre en los tratamientos de ACC empleados, sino que se mantuvo de una manera similar al de la plántula mutante crecida en el medio MS control (Fig. 17b). Si bien la mutante *drr1* responde normalmente al ACC en el crecimiento de la raíz primaria, es incapaz de producir raíces laterales inducidas por el compuesto.

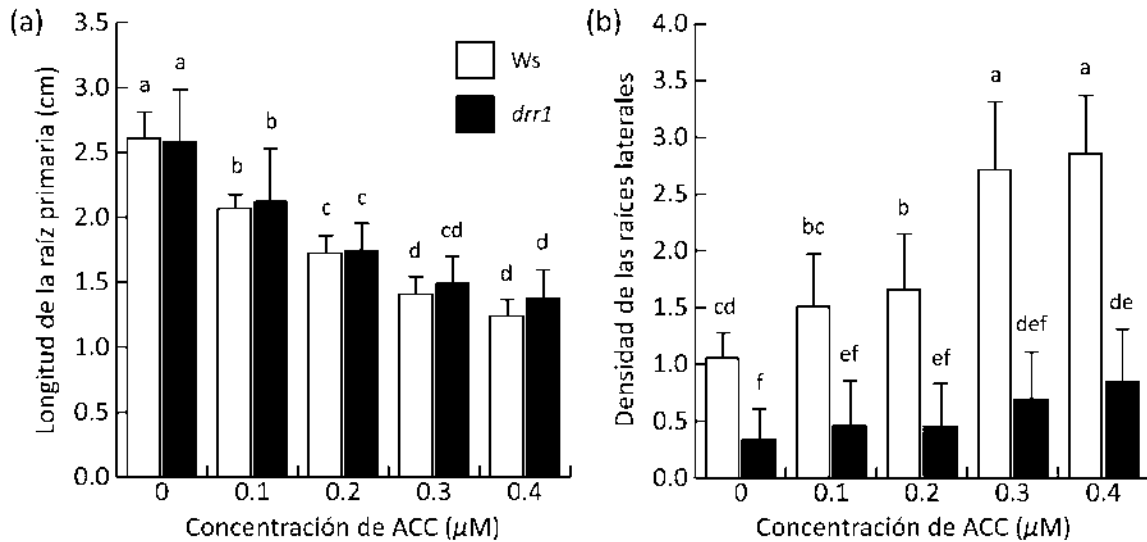


Figura 17. Respuesta de la mutante *drr1* al precursor del etileno (el ACC). Crecimiento de la raíz primaria (a) y la formación de raíces laterales (b) de la mutante *drr1* y su fondo genético Wassilewskija (Ws) a los siete días después de la germinación. El material biológico se creció en placas de Petri sobre medios MS0.2X en condiciones control y suplementados con ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). Los datos indican la media \pm la desviación estándar (n=15). Las letras distintas indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $p < 0.05$. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

7.3. Participación de elementos de la vía de señalización del etileno en las respuestas al ABA y a la C10-HL

7.3.1. La mutante *etr1* es más sensible al ABA que la plántula silvestre

La vía de señalización de etileno en plantas comienza cuando el gas se une a uno de sus cinco receptores y lo inactiva, mutaciones que impiden la unión del etileno con su receptor provocan un fenotipo insensible a los efectos del etileno, como ocurre en la mutante *etr1* (Chang *et al.*, 1993) y se puede evidenciar de manera indirecta cuando se crece a la mutante con el precursor de etileno, el ACC (Fig. 14). Cuando se creció a la mutante *etr1* en medios suplementados con ABA se observa un crecimiento de la raíz primaria y la densidad de raíces laterales similar al de la plántula silvestre en concentraciones inferiores a 0.25 μM. En los tratamientos de 0.5 y 1 μM la mutante *etr1* mostró un menor crecimiento de la raíz primaria (Fig. 18a) y la densidad de raíces laterales (Fig. 18b) en comparación a la plántula silvestre. Esta mayor sensibilidad al

efecto inhibitorio del crecimiento radicular inducido por el ABA en la mutante ocurre de manera dependiente de la concentración y parece también afectar el crecimiento del follaje, como se puede observar en las imágenes de la figura 18.

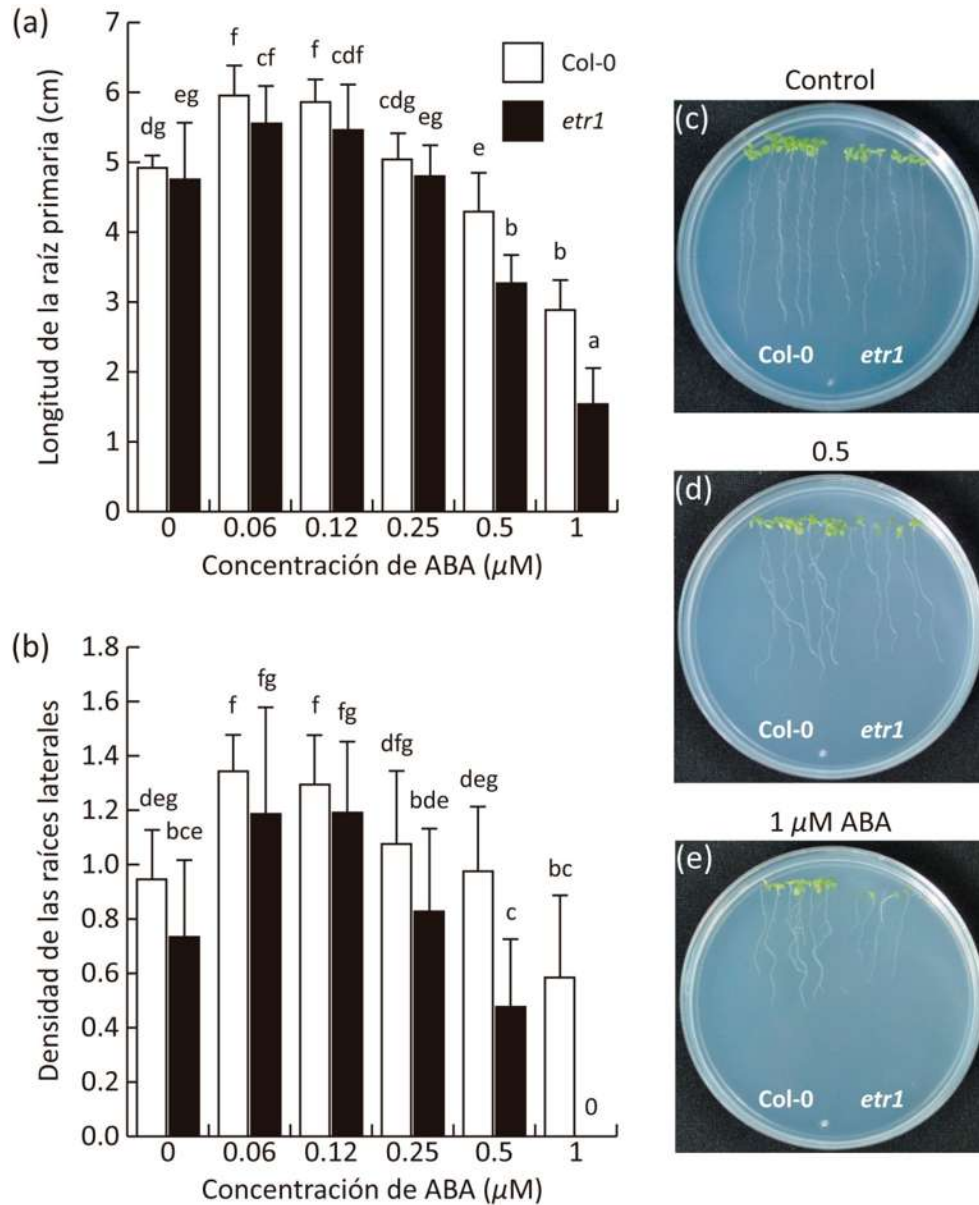


Figura 18. Crecimiento de la mutante *etr1* en respuesta al ABA. Crecimiento de la raíz primaria (a) y la formación de raíces laterales (b) de la mutante *etr1* y su fondo genético Columbia (Col-0) a los diez días después de la germinación. El material biológico se creció en placas de Petri sobre medios MS0.2X en condiciones control y suplementados con S-(+)-ácido abscísico (ABA). Las imágenes son representativas de las condiciones control (c) y las concentraciones donde se observó la mayor sensibilidad de *etr1* a los efectos del ABA (d-e). Los datos indican la media \pm la desviación estándar (n=15). Las letras distintas indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $p < 0.05$. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

7.3.2. La mutante insensible a etileno *ein2* es hipersensible al ABA

EIN2 es el tercer elemento en la señalización del etileno (Ju *et al.*, 2012), y debido a que no se ha podido encontrar en las plantas otra proteína que realice una función redundante de EIN2 en la ruta de señalización del etileno, se cree que este elemento es único en la ruta y por ello las mutaciones que provocan pérdida de función en EIN2 muestra el fenotipo más insensible al etileno (Alonso *et al.*, 1999; Schaller y Kieber, 2002; Zhao *et al.*, 2011). Debido a que EIN2 es un intermediario importante en la vía de señalización del etileno, decidimos evaluar a la mutante *ein2* (la cual tiene una mutación que provoca pérdida de la función en EIN2) (Guzmán y Ecker, 1990) en respuesta al ABA.

En condiciones control, *ein2* muestra una longitud de raíz primaria ligeramente mayor a la de la plántula silvestre, así como una mayor densidad de raíces laterales, ambos parámetros disminuyen drásticamente cuando la mutante crece en medios suplementados con la concentración más baja de la curva de ABA empleada (0.06 μ M), las concentraciones sucesivas disminuyen gradualmente la longitud de la raíz primaria hasta que en 1 μ M no se observa crecimiento (Fig. 19a). En tanto que, las raíces laterales dejan de formarse desde el tratamiento de 0.12 μ M (Fig. 19b). En las imágenes de la figura 19 se puede observar que no solo el crecimiento radicular se inhibe en respuesta al ABA en la mutante *ein2*, sino que el crecimiento global de la plántula se suprime desde la concentración más baja de ABA.

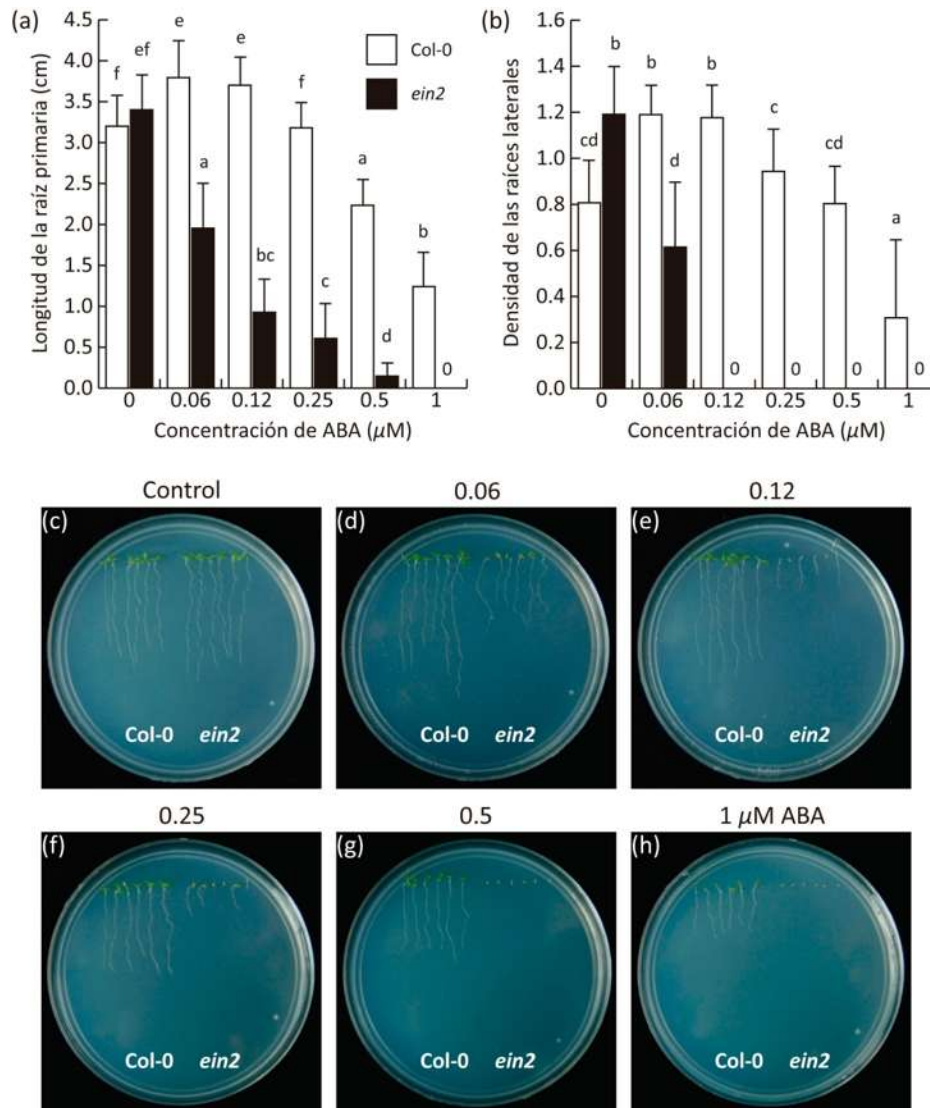


Figura 19. Crecimiento de la mutante *ein2* en respuesta al ABA. Crecimiento de la raíz primaria (a) y la formación de raíces laterales (b) de la mutante *ein2* y su fondo genético Columbia (Col-0) a los siete días después de la germinación. El material biológico se creció en placas de Petri sobre medios MS0.2X en condiciones control y suplementados con S-(+)-ácido abscísico (ABA). Las imágenes son representativas de las condiciones control (c) y cada una de las concentraciones de ABA empleadas (d-h). Los datos indican la media \pm la desviación estándar (n=15). Las letras distintas indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $p < 0.05$. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

7.3.3. Las raíz de la mutante *ein3* muestra una respuesta al ABA similar a la de la plántula silvestre

La ruta de señalización de etileno culmina cuando los factores de transcripción corriente abajo de EIN2 promueven la transcripción de genes de respuesta al etileno

(Zhao *et al.*, 2011), mutaciones que causan pérdida de la función de alguno de los factores de transcripción provocan fenotipos insensibles a etileno, como ocurre en la mutante *ein3* (Chao *et al.*, 1997). La mutante *ein3* no muestra un fenotipo muy diferente al de la plántula silvestre en la arquitectura radicular cuando se crece en medios basales, en respuesta al ABA, la raíz primaria de *ein3* crece de manera similar a como ocurre en la planta silvestre (Fig. 20a), de igual manera la densidad de raíces laterales de la mutante es muy similar a la de la plántula silvestre en cada uno de los tratamientos de ABA (Fig. 20b).

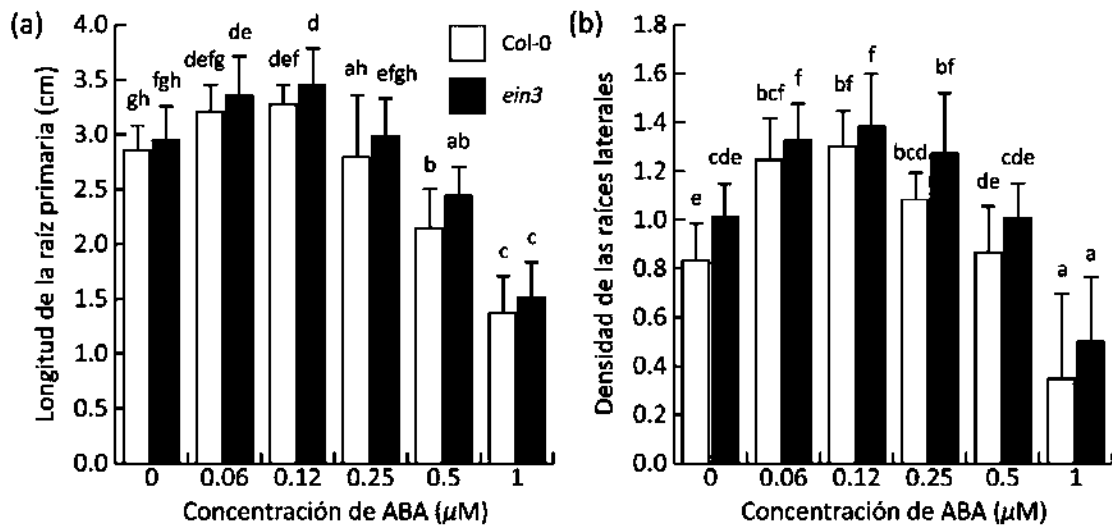


Figura 20. Crecimiento de la mutante *ein3* en respuesta al ABA. Crecimiento de la raíz primaria (a) y la formación de raíces laterales (b) de la mutante *ein3* y su fondo genético Columbia (Col-0) a los siete días después de la germinación. El material biológico se creció en placas de Petri sobre medios MS0.2X en condiciones control y suplementados con S-(+)-ácido abscisico (ABA). Los datos indican la media \pm la desviación estándar (n=15). Las letras distintas indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $p < 0.05$. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

7.3.4. Resistencia parcial de *ein2* a la modificación de la arquitectura radicular inducido por la C10-HL

Como *ein2* es hipersensible al ABA en la inhibición del crecimiento radicular (Fig. 19), además de ser la mutante más insensible a etileno (Alonso *et al.*, 1999; Schaller y Kieber, 2002; Zhao *et al.*, 2011), decidimos evaluar cuál sería la respuesta de la mutante al compuesto bacteriano C10-HL. Para realizar tal evaluación crecimos a las

mutantes *ein2* lado a lado con las plántulas silvestres (Col-0) a las diferentes concentraciones establecidas en el apartado 7.1. Como puede observarse en la figura 21a, esta línea mutante presentó una resistencia parcial a la inhibición del crecimiento de la raíz primaria en los tratamientos de C10-HL cuando se compara con el ecotipo silvestre, aunque la mutante mostró una inhibición del crecimiento gradual conforme se incrementa la concentración del compuesto, la longitud de la raíz de la plántula mutante no llegó a ser igual que aquella de la plántula silvestre en el mismo tratamiento.

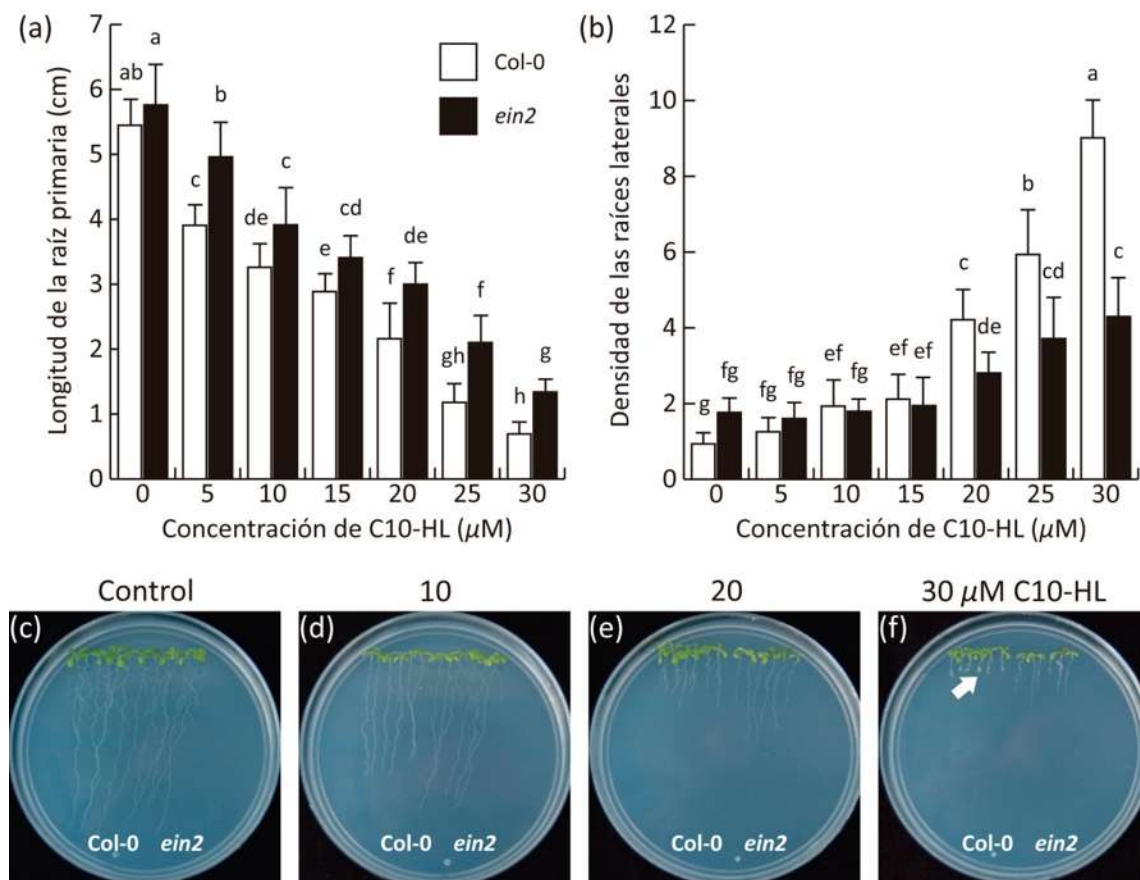


Figura 21. Crecimiento de la mutante *ein2* en respuesta a la C10-HL. Crecimiento de la raíz primaria (a) y la formación de raíces laterales (b) de la mutante *ein2* y su fondo genético Columbia (Col-0) a los diez días después de la germinación. El material biológico se creció en placas de Petri sobre medios MS0.2X en condiciones control y suplementados con *N*-decanoil-L-homoserina lactona (C10-HL). Las imágenes son representativas de las condiciones control (c) y algunas de las concentraciones de C10-HL empleadas (d-f). La flecha en (f) indica un incremento en la formación de pelos radiculares en las plantas silvestres (observado como un engrosamiento de la raíz). Los datos indican la media \pm la desviación estándar ($n=15$). Las letras distintas indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $p < 0.05$. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

Para el caso de las raíces laterales, a pesar de que *ein2* tiende a presentar una mayor densidad que el tipo silvestre en condiciones control, en los tratamientos de 20, 25 y 30 μM de C10-HL la mutante mostró una menor densidad de estas estructuras. En la plántula silvestre existe un incremento dosis dependiente en la densidad de raíces laterales, lo cual no ocurre en la plántula mutante en las concentraciones más bajas y aunque en las concentraciones más altas se observa un incremento evidente en la densidad de raíces laterales, este no llega a ser igual al de la plántula silvestre (Fig. 21b). Cabe mencionar que en la figura 21 (panel f) se puede observar que solamente la plántula silvestre presentan un incremento en la formación de pelos radiculares (observado como un engrosamiento de la raíz) de manera similar a como ocurre en respuesta al ACC (Fig. 14d-h).

7.4. Intervención de la vía de señalización del ABA en las respuestas al etileno y a la C10-HL

7.4.1. La expresión de *Abi4:gus* no se modifica en respuesta al ACC y a la C10-HL en la plántula silvestre

Debido a que el ABA parece tener un efecto opuesto al de la C10-HL y el ACC en la formación de raíces laterales, además de que la ausencia de *EIN2* en la planta puede provocar hipersensibilidad al ABA e insensibilidad al ACC y resistencia a la C10-HL (lo que ocurre en las mutante *ein2*), decidimos evaluar si el ACC y la C10-HL eran capaces de modificar la expresión del marcador de respuesta al ABA *Abi4:gus*. En las líneas *Abi4:gus* crecidas en medios suplementados con ACC (capaz de modificar la arquitectura radicular en plántulas silvestres a concentraciones de 0.1 a 0.4 μM), no se observa un cambio significativo en la expresión del marcador en el follaje (Fig. 22a-e) y la raíz (Fig. 22f-j) bajo los tratamientos, aunque si se puede observar el efecto del ACC induciendo la formación y el crecimiento de pelos radiculares hacia la punta de la raíz (Fig. 22g-j). Lo mismo se observó cuando la línea marcadora se creció a diferentes

concentraciones de la C10-HL, donde no se observaron cambios significativos en la expresión del marcador *Abi4:gus* (Fig. 22k-x).

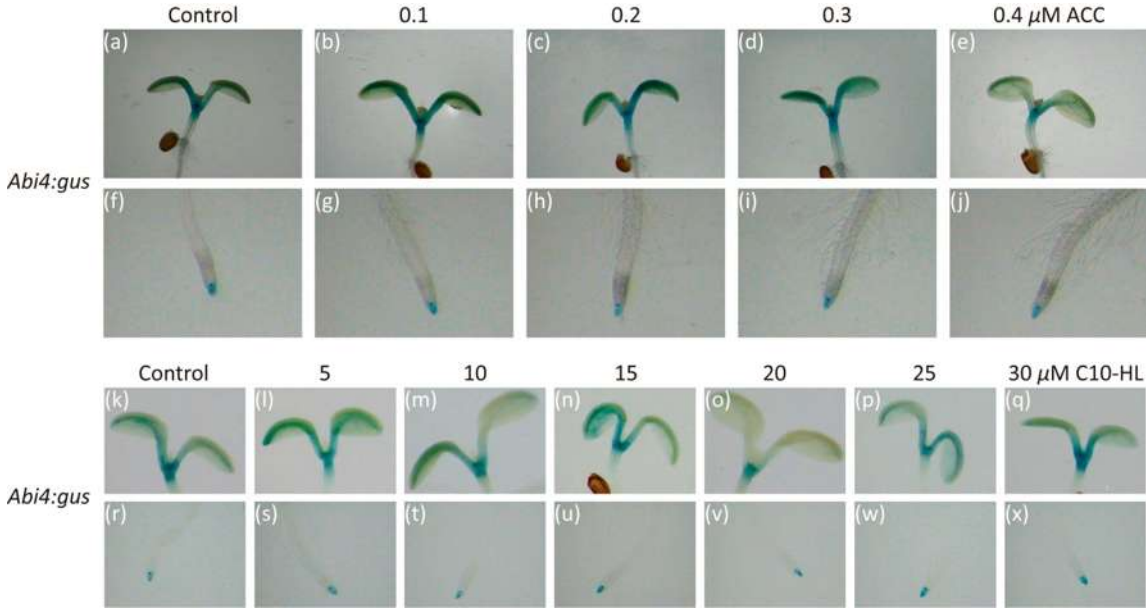


Figura 22. Expresión del marcador *Abi4:gus* en la plántula silvestre de *Arabidopsis* en respuesta al ACC y a la C10-HL. Plántulas *Abi4:gus* a los 3 días después de la germinación crecidas en cajas de Petri con medios MS0.2X en condiciones control y suplementados con las concentraciones del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) y la *N*-decanoil-L-homoserina lactona (C10-HL) indicadas. El material biológico fue tratado bajo el protocolo de Jefferson *et al.* (1987) para inducir la actividad β -glucuronidasa y el de Malamy y Benfey (1997) para aclarar el tejido. La coloración azul es indicativo de la expresión del marcador de respuesta al ABA. Las imágenes son representativas de una muestra de 10 plántulas sometidas al mismo tratamiento. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

7.4.2. La mutante *abi5* es resistente al ABA pero no muestra diferencias a la plántula silvestre en las respuestas al ACC y a la C10-HL en la raíz

Las mutantes *abi1*, *abi2*, *abi3* y *abi5* (*abi1-3,5*) fueron identificadas por su insensibilidad a los efectos del ABA reprimiendo la germinación (Koornneef *et al.*, 1984; Finkelstein, 1994). En vista de que la germinación y el crecimiento radicular son dos procesos distintos, analizamos si estas mutantes insensibles al ABA en la germinación también lo eran en el crecimiento radicular o al menos mostraban una resistencia a los efectos del compuesto. La figura 23a muestra el crecimiento de la raíz primaria de las mutantes *abi1-3,5* en condiciones control y en una concentración inhibitoria del

crecimiento de la raíz primaria de ABA, en donde se observó que las mutantes *abi1*, *abi2* y *abi3* no mostraron resistencia a los efectos represores del crecimiento del ABA cuando se compararon con la plántula silvestre (Ler), en tanto que la mutante *abi5* presentó una clara resistencia al efecto inhibitorio del crecimiento del ABA cuando se comparó con su ecotipo Ws.

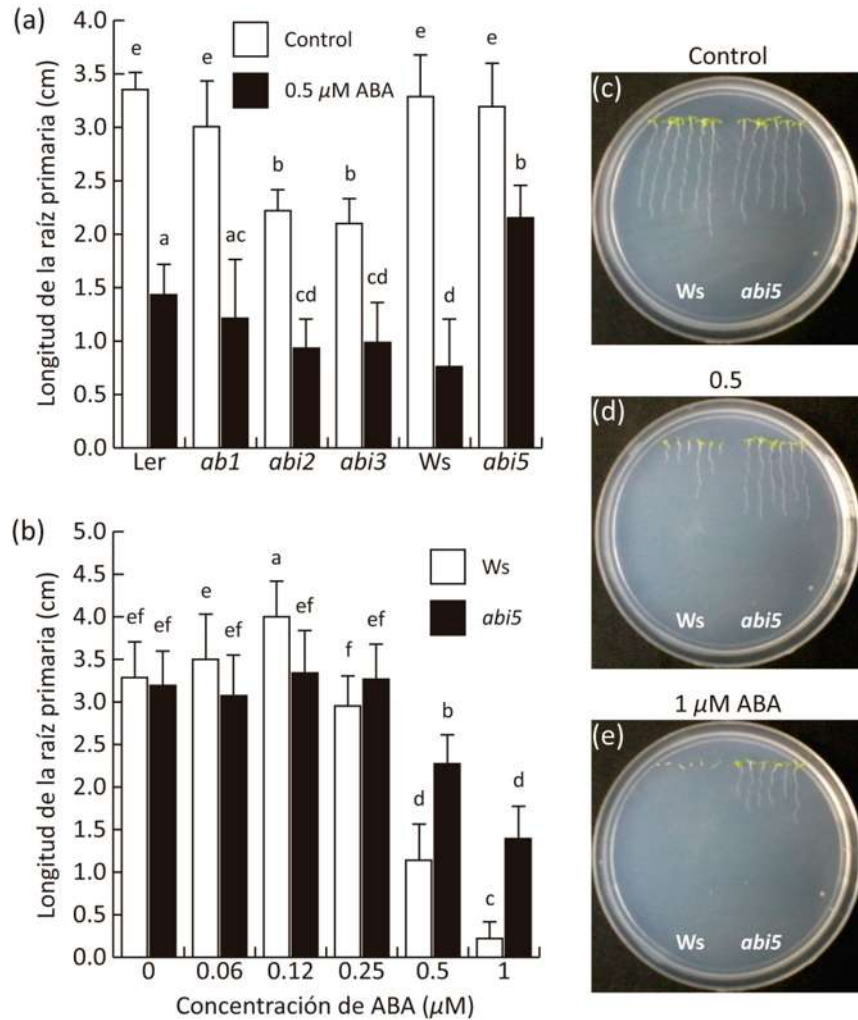


Figura 23. Análisis de la resistencia al efecto del ABA en el crecimiento radicular de las mutantes *abi1*, *abi2*, *abi3* y *abi5*. (a) Crecimiento de la raíz primaria de las mutantes insensibles al ácido abscísico en la germinación *abi1*, *abi2*, *abi3*, y *abi5* así como de sus fondos genéticos (Ler para las primeras tres y Ws para la última). (b) Crecimiento de la raíz primaria de la mutante *abi5*. El material biológico se creció siete días después de la germinación en placas de Petri sobre medios MS0.2X en condiciones control y suplementados con S-(+)-ácido abscísico (ABA). Las imágenes son representativas de las condiciones control (c) y los tratamientos donde *abi5* mostró la resistencia al efecto represor del crecimiento radicular del ABA (d-e). Los datos indican la media \pm la desviación estándar (n=15). Las letras distintas indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $p < 0.05$. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

La mutante *abi5* crecida bajo el rango de concentraciones de ABA que va de 0.06 a 1 μ M, no mostró cambios en su crecimiento de la raíz primaria en los tratamientos inferiores a 0.25 μ M, en tanto que en los tratamientos que inhiben el crecimiento (0.5 y 1 μ M) se observó una resistencia en la mutante (Fig. 23b). Un análisis completo bajo el rango de concentraciones de ABA se llevó a cabo para cada una de las mutantes; y en ningún tratamiento las mutantes *abi1*, *abi2* y *abi3* mostraron una resistencia al compuesto, la gráfica de la figura 23a resume esta información.

Si bien la mutante *abi5* es resistente a los efectos del ABA inhibiendo el crecimiento radicular, el análisis del crecimiento de la raíz primaria de esta mutante en respuesta al ACC y la C10-HL no mostró diferencias con el ecotipo silvestre a las distintas concentraciones de ambos compuestos, el acortamiento de la raíz primaria ocurrió de manera dependiente de la concentración del ACC (Fig. 24a) y la C10-HL (Fig. 24b) en la mutante *abi5* y su fondo genético el ecotipo Ws.

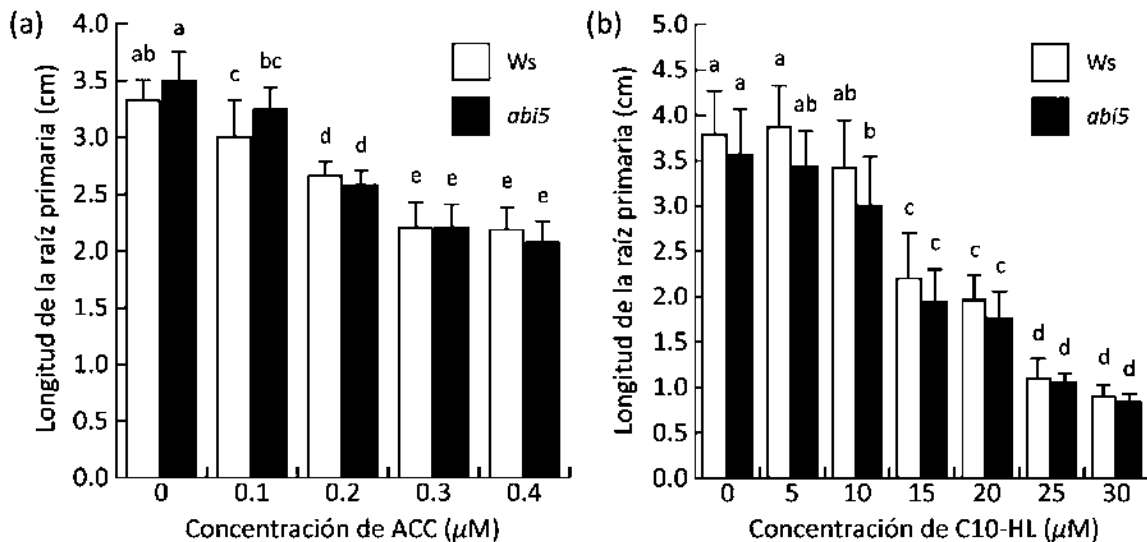


Figura 24. Efectos del ACC y la C10-HL sobre el crecimiento radicular de la mutante *abi5*. Crecimiento de la raíz primaria de la mutante *abi5* y su fondo genético Ws en medios controles y suplementados con el ACC (a) y la C10-HL (b). El material biológico se creció siete días después de la germinación en placas de Petri sobre medios MS0.2X en condiciones control y suplementados con el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) y la *N*-decanoil-L-homoserina lactona (C10-HL). Los datos indican la media \pm la desviación estándar (n=15). Las letras distintas indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $p < 0.05$. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

8. DISCUSIÓN

De manera similar a como ocurre en la germinación de las semillas, el ABA inhibe el crecimiento y el desarrollo radicular de las plántulas silvestres de *Arabidopsis*, siendo este efecto dependiente de la concentración. La figura 13 muestra que la inhibición del crecimiento y el desarrollo radicular en distintos ecotipos de *Arabidopsis thaliana* es diferencial. El ecotipo Columbia parece ser el más resistente al ABA de los tres analizados en este estudio, seguido por Ws, en tanto que el ecotipo Ler mostró la mayor sensibilidad. Estas diferencias en respuesta al ABA pueden ser debido a que en cada ecotipo se producen cantidades distintas de ABA de manera natural o bien porque la vía de señalización de esta fitohormona es más activa en un ecotipo con respecto a otro. Cantidades pequeñas de ABA (por ej. 0.06 y 0.12 μM) muestran un efecto ligeramente promotor en Col-0 y Ws, lo que evidencia la importancia de esta hormona para el crecimiento y desarrollo de las plántulas; y aunque Ler parece ser el ecotipo más diferente a los otros dos, concentraciones superiores a 0.5 μM presentan un efecto represor global en las tres líneas silvestres (Fig. 13a). Para el caso del ACC, si bien el compuesto tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de la raíz primaria, el incremento de la densidad de las raíces laterales y la formación de pelos radiculares vía la señalización de etileno, aumentan considerablemente la superficie de absorción de la raíz en las plántulas. Dichas modificaciones en la arquitectura radicular vía etileno parecen contraponerse al efecto represor del ABA en la raíz, al igual que ocurre en la germinación. Caso similar al del ACC ocurre también en respuesta a la C10-HL (Fig. 9f-h y 12b). Todos estos datos en conjunto permiten concluir que el ACC y la C10-HL se contraponen a los efectos del ABA en la raíz de *A. thaliana*.

La interrupción del locus *DRR1* con la consecuente pérdida de la función de la proteína putativa provoca una mayor sensibilidad a los efectos represores sobre el crecimiento de la raíz primaria y el desarrollo de estructuras nuevas como las raíces laterales en respuesta al ABA, lo cual indica que una posible función de este locus sería la de bloquear la actividad represora del ABA (Fig. 15). La capacidad bloqueadora de

DRR1 correlaciona bien con la mayor expresión del marcador de respuesta al ABA *Abi4:gus* en las mutantes *drr1* (Fig. 16). La mayor expresión de *Abi4:gus* en *drr1* significa que *DRR1* es capaz de regular negativamente los efectos del ABA a través de la represión de la expresión de *ABI4*, este último codifica para un factor de transcripción involucrado en la ruta de señalización del ABA (Raghavendra *et al.*, 2010). El factor de transcripción *ABI4* además de promover la expresión de genes de respuesta al ABA también promueve la expresión de *ABI3* y *ABI5* (Söderman *et al.*, 2000), por lo que una mayor expresión de *Abi4:gus* indirectamente indicaría una mayor expresión de los tres genes que codifican para los tres factores de transcripción que participan en la ruta de señalización nuclear del ABA; y posiblemente una mayor actividad de la vía. Estos resultados nos permiten proponer que *DRR1* regula negativamente la señalización nuclear del ABA a través de la represión del gen que codifica para el factor de transcripción *ABI4* e indirectamente de los genes que codifican para *ABI3* y *ABI5* (Fig. 25). Cuando la vía de señalización de etileno es estimulada con el ACC, la mutante *drr1* solo muestra resistencia a la formación de raíces laterales en tanto que el crecimiento de la raíz primaria se acorta como en la plántula silvestre (Fig. 17), lo antes mencionado sugeriría que el proceso del desarrollo en la raíz vía etileno requiere la participación de *DRR1*. La ausencia de una resistencia en el acortamiento de la raíz primaria de la mutante *drr1* y el ligero incremento en la formación de raíces laterales en el tratamiento más alto de ACC, indicaría que la función de *DRR1* en la señalización de etileno es discreta, ya sea porque el mecanismo por el cual participa en la vía es indirecto o bien porque su función en ella puede ser suplida por uno o más genes redundantes. Estos resultados y el antecedente de Morquecho-Contreras y Col. (2010) permiten sugerir que *DRR1* es necesario para la percepción del compuesto bacteriano C10-HL y para la señalización de etileno además de regular negativamente la señalización del ABA en la raíz (Fig. 25).

Respecto a la vía de señalización de etileno, el análisis se realizó a tres niveles: de un receptor, un intermediario y un factor de transcripción. En relación al receptor, la mutante *etr1* afectada en la activación de uno de los cinco receptores de etileno

evidencia que la pérdida de la función de ETR1 confiere una mayor sensibilidad al ABA en el crecimiento y el desarrollo radicular (Fig. 18). Lo anterior indicaría que el papel de *ETR1* en las raíces de plántulas silvestres es el de regulador negativo de los efectos de ABA (Fig. 25). Cascada abajo de ETR1 se encuentra EIN2, el cual recibe la señal de los cinco receptores de etileno a través de la cinasa CTR1 (Ju *et al.*, 2012). Como observamos en la figura 19 la pérdida de la actividad de EIN2, en la mutante *ein2*, provoca una hipersensibilidad al ABA, la cual es evidente aún en concentraciones bajas del compuesto. Los resultados anteriores sugieren que *EIN2* participa como regulador negativo de la vía de señalización del ABA (Fig. 25). La hipersensibilidad en *ein2* puede ser atribuida a que EIN2 regula negativamente la actividad de un elemento importante en la ruta de señalización del ABA o bien porque actúa a varios niveles en la ruta. Sin embargo, el antecedente de que *ein2* no rescata el fenotipo de insensibilidad al ABA en la germinación de la mutante *abi3* (Beaudoin *et al.*, 2000), indicaría que EIN2 puede estar arriba de los factores transcripcionales de la ruta del ABA. Análisis en mutantes dobles como *ein2xabi3* o *ein2xabi5* junto con registros de la expresión de *Abi4:gus* en *ein2*, serían útiles para establecer el papel de EIN2 corriente arriba de los factores de transcripción en la ruta del ABA. Al final de la vía del etileno, a nivel de los factores de transcripción, mutaciones que confieren pérdida de la función de uno de estos elementos (siendo el caso de la mutante *ein3*), provocan una insensibilidad al etileno (Chao *et al.*, 1997). En nuestro estudio se mostró que *EIN3* no parece estar implicado en la interacción con la vía de señalización del ABA, ya que la inactivación de este gen no alteró la respuesta de la raíz al ABA ni en el crecimiento ni en el desarrollo (Fig. 20).

La respuesta de sensibilidad parcial al ABA en la mutante *etr1* puede ser atribuida a que en *Arabidopsis* se conocen al menos cinco tipos de receptores de etileno (Zhao *et al.*, 2011) y cuando se muta uno de los cinco genes que codifican para los receptores, los otros cuatro podrían suplir su función. Para el caso de la hipersensibilidad al ABA observada en *ein2*, la posible explicación es que al parecer no existe otro gen que codifique para una proteína con actividad redundante a EIN2 en la planta, por lo que la ausencia de la función de EIN2 en la mutante *ein2* no es suplida

por otra proteína (Zhao *et al.*, 2011). Probablemente se podría observar una hipersensibilidad similar a la de *ein2* a nivel de receptor si se mutaran los cinco genes que codifican para receptores en *A. thaliana* (*ERS1*, *ERS2*, *EIN4*, *ETR1* y *ETR2*). Finalmente, hay tres posibles explicaciones para el comportamiento similar a la plántula silvestre en *ein3*: (I) que el mecanismo por el cual interactúa EIN2 con la ruta de señalización del ABA no implica a EIN3 sino a otro factor de transcripción; (II) que los otros cinco factores de transcripción (*EIL1*, 2, 3, 4 y 5; Guo y Ecker, 2004) suplan la ausencia de la función de EIN3 como posiblemente ocurre cuando se muta uno de los receptores, o bien (III) que simplemente los factores de transcripción de etileno no participan en la interacción con el ABA.

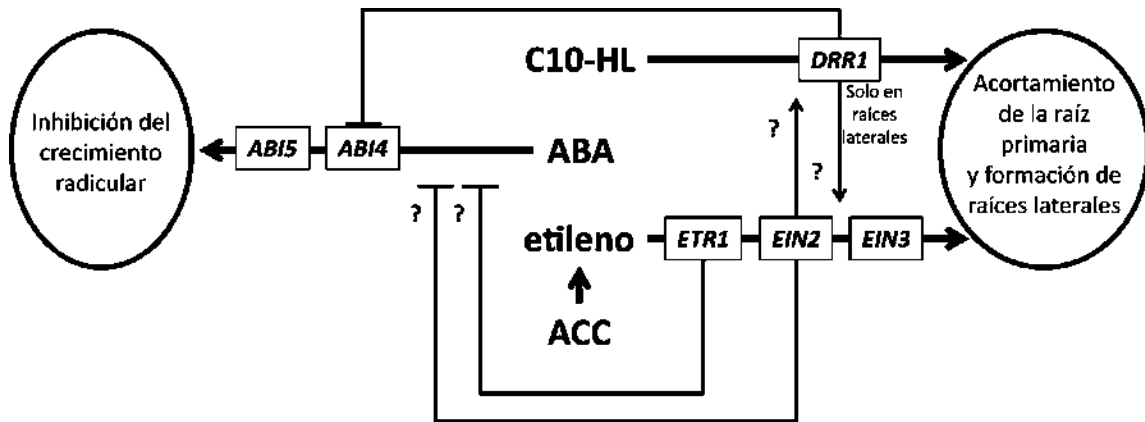


Figura 25. Modelo de la interacción entre la C10-HL, el ABA y el etileno en el crecimiento y el desarrollo radicular de *Arabidopsis thaliana*. Las líneas gruesas indican procesos previamente demostrados en tanto que las delgadas señalan la interacción propuesta en este estudio. La punta de flecha indica la inducción de un proceso en tanto que la línea perpendicular señala la represión del mismo.

La participación de la ruta de señalización del etileno en la interacción con la C10-HL parece ser a través de *EIN2*, ya que la mutante *ein2* muestra una resistencia parcial al acortamiento de la raíz primaria y la formación de raíces laterales (Fig. 21). Lo anterior propone que *EIN2* es un elemento necesario para la percepción del compuesto bacteriano por la raíz (Fig. 25). Es posible que una mutante doble de *ein2xdr1* muestre una insensibilidad a la C10-HL en lugar de solo resistencia como ocurre cuando se tiene las mutaciones por separado, lo cual demostraría que *EIN2* y *DRR1* actúan por

mecanismos diferentes para que la planta pueda percibir la C10-HL, lo cual es posible debido a que existen diferencias fenotípicas entre *drr1* y *ein2* en condiciones control.

Aunque el ACC y la C10-HL se contraponen a los efectos del ABA, el mecanismo por el cual realizan esto parece no implicar la inhibición de la expresión de *ABI4*, no obstante que el ABA requiere una mayor expresión de este gen para ejercer su actividad en la raíz. Como se muestra en la figura 22, donde la expresión de *Abi4:gus* no se modifica por los tratamientos con el ACC y la C10-HL. Lo anterior indicaría que el mecanismo por el cual el ACC y la C10-HL antagonizan al ABA ocurriría por la inhibición de la expresión de otro gen de la ruta del ABA o por modificaciones postraduccionales de las proteínas de la ruta del ABA que conduzcan a una inactivación o una degradación. Esto último es probable que ocurra en la vía del etileno, ya que EIN2 regula la degradación de proteínas (los factores de transcripción EIN3, EIL1 y probablemente los otros EILs) en el proteosoma 26S (An *et al.*, 2010); y la abundancia del factor de transcripción ABI5 es regulada por su degradación en el proteosoma 26S (Miura *et al.*, 2009). La razón por la que la mutante *abi5* no muestra diferencias en el crecimiento con respecto de la plántula silvestre en respuesta al ACC (Fig. 24a), podría deberse a que la interacción entre las vías de señalización del ABA y el etileno solo se presenta de manera unilateral en la vía del etileno a nivel de EIN2, la cual regularía la abundancia de ABI5 de la vía del ABA. Así que, el que ABI5 no se encuentre en la mutante *abi5* si afectaría la señalización del ABA (causando resistencia al ABA en la mutante) cuando se estimula la vía con el ABA suplementado de manera exógena (Fig. 23b). Sin embargo, cuando se aplica ACC y se estimula la vía del etileno, no hay respuesta en la mutante *abi5* porque el etileno posiblemente actúa promoviendo la degradación de la proteína que no se encuentra en esa mutante. Para apoyar la hipótesis anterior, es necesaria una doble mutante *ein2xabi5* donde la mutación en *abi5* rescatará el fenotipo de hipersensibilidad al ABA, en tanto que en respuesta al etileno, esta doble mutante se comportara como la mutante sencilla *ein2*. Para el caso de la interacción de la C10-HL y el ABA, aunque se desconoce si DRR1 regula la degradación vía proteosomal, es posible asumir que la interacción solo ocurre de DRR1

hacia la vía del ABA y no de manera inversa; porque de manera similar a *ein2*, la mutante *drr1* es más sensible al ABA que la plántula silvestre pero la mutante *abi5* no responde en forma diferente a la plántula silvestre con los tratamientos con la C10-HL (Fig. 24b). La mutante digénica *drr1xabi5*, también sería necesaria para respaldar lo anterior, si la mutación en *abi5* rescatará el fenotipo de mayor sensibilidad al ABA en tanto que en respuesta a la C10-HL esta doble mutante se comportará como la mutante sencilla *drr1*. De manera similar se pueden probar mutantes digénicas *drr1xabi1* y *drr1xabi3*, ya que para el caso de *DRR1*, no se ha establecido a que nivel exacto en la vía del ABA es donde interactúa. Aquí solamente mostramos que *DRR1* aparentemente se encuentra río arriba de *ABI4*, el cual se localiza al final de la vía y es posible que *DRR1* afecte también a otros elementos corriente arriba (*ABI1*) o al mismo nivel (*ABI3*) de *ABI4*.

9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el locus *DRR1* es necesario para la percepción del compuesto bacteriano C10-HL y la regulación negativa de los efectos del ABA inhibiendo el crecimiento y el desarrollo radicular a través de la represión de la expresión de *ABI4*, el cual codifica para un factor de transcripción de la vía de señalización del ABA. Además *DRR1* es requerido en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana* inducido por el etileno. Los genes *ETR1* y *EIN2* que codifican para elementos de la ruta de señalización del etileno regulan negativamente los efectos del ABA, inhibiendo el crecimiento y el desarrollo radicular. *EIN2* parece ser el nodo de una red de señalización que reprime la vía del ABA (por un mecanismo distinto de *EIN3*) y activa la del etileno en la raíz. Este nodo también es necesario para la percepción del compuesto bacteriano C10-HL por la raíz de *Arabidopsis*. Finalmente, debido a que la C10-HL y el etileno fueron incapaces de modificar la expresión del gen *ABI4* y que el gen *ABI5* es esencial para los efectos del ABA pero no para los de la C10-HL y el etileno, se sugiere que estos genes no están implicados ni en la percepción de la C10-HL ni en la señalización del etileno en la raíz. En conjunto, lo antes mencionado indicaría que la interacción parece ocurrir entre la C10-HL y el etileno hacia el ABA, pero no de manera inversa en la raíz de *A. thaliana*.

10. REFERENCIAS

- Alonso J. M., Hirayama T., Roman G., Nourizadeh S. y Ecker J. R. (1999).** EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science* 284: 2148-2152.
- An F., Zhao Q., Ji Y., Li M., Jiang Z., Yu X., Zhang C., Han Y., He W., Liu Y., Zhang S., Ecker J. y Guo H. (2010).** Ethylene-induced stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE3 and EIN3-LIKE1 is mediated by proteasomal degradation of EIN3 binding F-Box 1 and 2 that requires EIN2 in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 22: 2384-2401.
- Bais H. P., Weir T. L., Perry L. G., Gilroy S. y Vivanco J. M. (2006).** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *The Annual Review of Plant Biology* 57: 233-266.
- Bauer W. D., Mathesius U. y Teplitski M. (2005).** Eukaryotes deal with bacterial quorum sensing. *American Society for Microbiology News* 71: 129-135.
- Beaudoin N., Serizet C., Gosti F. y Giraudat J. (2000).** Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *The Plant Cell* 12: 1103-1115.
- Blancaflor E. B., Hou G. y Chapman K. D. (2003).** Elevated levels of *N*-lauroylethanolamine, an endogenous constituent of desiccated seeds, disrupt normal root development in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Planta* 217: 206-217.
- Bleecker A. B., Estelle M. A., Somerville C. y Kende H. (1988).** Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 241: 1086-1089.
- Casimiro I., Beeckman T., Graham N., Bhalerao R., Zhang H., Casero P., Sandberg G. y Bennett M. J. (2003).** Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends in Plant Science* 8: 165-171.
- Chandler J. W. (2009).** Auxin as compère in plant hormone crosstalk. *Planta* 231: 1-12.
- Chang C., Kwok S. F., Bleecker A. B. y Meyerowitz E. M. (1993).** *Arabidopsis* ethylene response gene *ETR1*: similarity of product to two-component regulators. *Science* 262: 539-544.

Chao Q., Rothenberg M., Solano R., Roman G., Terzaghi W. y Ecker J. R. (1997). Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE 3 and related proteins. *Cell* 89: 1133-1144.

Chapman K. D. (2000). Emerging physiological roles for *N*-acylphosphatidylethanolamine metabolism in plants: signal transduction and membrane protection. *Chemistry and Physics of Lipids* 108: 221-229.

Cheng W.-H., Chiang M.-H., Hwang S.-G. y Lin P.-C. (2009). Antagonism between abscisic acid and ethylene in *Arabidopsis* acts in parallel with the reciprocal regulation of their metabolism and signaling pathways. *Plant Molecular Biology* 71:61-80.

Cho H.-T. y Cosgrove D. J. (2002). Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 14: 1-17.

Choi H.-I., Park H.-J., Park J. H., Kim S., Im M.-Y., Seo H.-H., Kim Y.-W., Hwang I. y Kim S. Y. (2005). *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase AtCPK32 interacts with ABF4, a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, and modulates its activity. *Plant Physiology* 139: 1750-1761.

Clark K. L., Larsen P. B., Wang X. y Chang C. (1998). Association of the *Arabidopsis* CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS1 ethylene receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 5401-5406.

Cotter M. Q., Teaster N. D., Blancaflor E. B. y Chapman K. D. (2011). *N*-Acylethanolamine (NAE) inhibits growth in *Arabidopsis thaliana* seedlings via ABI3-dependent and -independent pathways. *Plant Signaling & Behavior* 6: 671-679.

De Petrocellis L., Cascio M. G. y Di Marzo V. (2004). The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *British Journal of Pharmacology* 141: 765-774.

De Smet I., Lau S., Voß U., Vanneste S., Benjamins R., Rademacher E. H., Schlereth A., De Rybel B., Vassileva V., Grunewald W., Naudts M., Levesque M. P., Ehrismann J. S., Inzé D., Luschnig C., Benfey P. N., Weijers D., Van Montagu M. C. E., Bennett M. J., Jürgens G. y Beeckman T. (2010). Bimodular auxin response controls organogenesis in *Arabidopsis*. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 2705-2710.

De Smet I., Vassileva V., De Rybel B., Levesque M. P., Grunewald W., Van Damme D., Van Noorden G., Naudts M., Van Isterdael G., De Clercq R., Wang J. Y., Meuli N., Vanneste S., Friml J., Hilson P., Jürgens G., Ingram G. C., Inzé D., Benfey P. N. y Beeckman T. (2008). Receptor-like kinase ACR4 restricts formative cell divisions in the *Arabidopsis* root. *Science* 322: 594-597.

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

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

Dubrovsky J. G., Doerner P. W., Colón-Carmona A. y Rost T. L. (2000). Pericycle cell proliferation and lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 124:1648-1657.

Dubrovsky J. G., Gambetta G. A., Hernández-Barrera A., Shishkova S. y González I. (2006). Lateral root initiation in *Arabidopsis*: developmental window, spatial patterning, density and predictability. *Annals of Botany* 97: 903-915.

Dubrovsky J. G., Sauer M., Napsucialy-Mendivil S., Ivanchenko M. G., Friml J., Shishkova S., Celenza J. y Benková E. (2008). Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 8790-8794.

Finkelstein R. R. (1994). Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *The Plant Journal* 5: 765-771.

Finkelstein R. R., Gampala S. S. L., Lynch T. J., Thomas T. L. y Rock C. D. (2005). Redundant and distinct functions of the ABA response loci ABA-INSENSITIVE (ABI) 5 and ABRE-BINDING FACTOR (ABF) 3. *Plant Molecular Biology* 59: 253-267.

Finkelstein R. R. y Rock C. D. (2002). Abscisic acid biosynthesis and response. *The Arabidopsis Book* 1: 1-48.

Finkelstein R. R. y Somerville C. R. (1990). Three classes of abscisic acid (ABA)-insensitive mutations of *Arabidopsis* define genes that control overlapping subsets of ABA responses. *Plant Physiology* 94: 1172-1179.

Gagne J. M., Smalle J., Gingerich D. J., Walker J. M., Yoo S. D., Yanagisawa S. y Vierstra R. D. (2004). *Arabidopsis* EIN3-binding F-box 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3 degradation. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:6803-6808.

Galway M. E., Masucci J. D., Lloyd A., Walbot V., Davis R. W. y Schiefelbein J. W. (1994). The *TTG* gene is required to specify epidermal cell fate and cell patterning in the *Arabidopsis* root. *Developmental Biology* 166: 740-754.

Gamble R. L., Coonfield M. L. y Schaller G. E. (1998). Histidine kinase activity of the ETR1 ethylene receptor from *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 7825-7829.

Ghassemian M., Nambara E., Cutler S., Kawaide H., Kamiya Y. y McCourt P. (2000). Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 12: 1117-1126.

Geiger D., Scherzer S., Mumm P., Marten I., Ache P., Matschi S., Liese A., Wellmann C., Al-Rasheid K. A. S., Grill E., Romeis T., y Hedrich R. (2010). Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 8023-8028.

Geiger D., Scherzer S., Mumm P., Stange A., Marten I., Bauer H., Ache P., Matschi S., Liese A., Al-Rasheid K. A. S., Romeis T., y Hedrich R. (2009). Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 21425-21430.

Gray W. M. (2004). Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS Biology* 2:1270-1273.

Grierson C. y Schiefelbein J. (2002). Root hairs. *The Arabidopsis Book* 1:1-22.

Guo H. y Ecker J. R. (2003). Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF(EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell* 115: 667-677.

Guo H. y Ecker J. R. (2004). The ethylene signaling pathway: new insights. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 40-49.

Guzmán P. y Ecker J. R. (1990). Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *The Plant Cell* 2: 513-523.

Hirayama T. y Shinozaki K. (2007). Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends in Plant Science* 12: 343-351.

Hrabak E. M., Chan C. W., Gribskov M., Harper J. F., Choi J. H., Halford N., Kudla J., Luan S., Nimmo H. G., Sussman M. R., Thomas M., Walker-Simmons K., Zhu J.-K. y Harmon A. C. (2003). The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiology* 132: 666-680.

Ichimura K., Mizoguchi T., Yoshida R., Yuasa T., y Shinozaki K. (2000). Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *The Plant Journal* 24: 655-665.

Jefferson R. A., Kavanagh T. A. y Bevan M. W. (1987). GUS fusions: β -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The European Molecular Biology Organization Journal* 6: 3901-3907.

Ju C., Yoon G. M., Shemansky J. M., Lin D. Y., Ying I., Chang J., Garrett W. M., Kessenbrock M., Groth G., Tucker M. L., Cooper B., Kieber J. J. y Chang C. (2012). CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 19486-19491.

Kanbe K., Naganawa H., Okamura M., Sasaki T., Hamada M., Okami Y. y Takeuchi T. (1993). Amidenin, a new plant Growth-regulating substance isolated from *Amycolatopsis sp.* *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 57: 1261-1263.

Kieber J. J., Rothenberg M., Roman G., Feldman K. A. y Ecker J. R. (1993). *CTR1*, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell* 72: 427-441.

Knight L. I., Rose R. C. y Crocker W. (1910). Effects of various gases and vapors upon etiolated seedlings of the sweet pea. *Science* 31: 635-636.

Koornneef M., Reuling G. y Karssen C. M. (1984). The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 61: 377-383.

Kuppusamy K. T., Walcher C. L. y Nemhauser J. L. (2009). Cross-regulatory mechanisms in hormone signaling. *Plant Molecular Biology* 69: 375-381.

Lee S.C., Lan W., Buchanan B. B. y Luan S. (2009). A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 21419-21424.

Leung J., Bouvier-Durand M., Morris P. C., Guerrier D., Cheddor F. y Giraudat J. (1994). *Arabidopsis* ABA response gene *ABI1*: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* 264: 1448-1452.

Leung J., Merlot S. y Giraudat J. (1997). The *Arabidopsis* *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 2* (*ABI2*) and *ABI1* genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *The Plant Cell* 9: 759-771.

Liu Y. y Zhang S. (2004). Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 16: 3386-3399.

López-Bucio J., Cruz-Ramírez A. y Herrera-Estrella L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology* 6:280-287.

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 Physiology* 145: 1703-1713.

Ma Y., Szostkiewicz I., Korte A., Moes D., Yang Y., Christmann A. y Grill E. (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324: 1064-1068.

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

Marin E., Jouannet V., Herz A., Lokerse A. S., Weijers D., Vaucheret H., Nussaume L., Crespi M. D. y Maizel A. (2010). miR390, *Arabidopsis* TAS3 tasiRNAs, and their AUXIN RESPONSE FACTOR targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth. *The Plant Cell* 22: 1104-1117.

Masucci J. D., Rerie W. G., Foreman D. R., Zhang M., Galway M. E., Marks M. D. y Schiefelbein J. W. (1996). The homeobox gene *GLABRA 2* is required for position-dependent cell differentiation in the root epidermis of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 122: 1253-1260.

Masucci J. D. y Schiefelbein J. W. (1996). Hormones act downstream of *TTG* and *GL2* to promote root hair outgrowth during epidermis development in the *Arabidopsis* root. *The Plant Cell* 8: 1505-1517.

Mathesius U., Mulders S., Gao M., Teplitski M., Caetano-Anollés G., Rolfe B. G. y Bauer W. D. (2003). Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 1444-1449.

Meyer K., Leube M. P. y Grill E. (1994). A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 264: 1452-1455.

Miura K., Lee J., Jin J. B., Yoo C. Y., Miura T. y Hasegawa P. M. (2009). Sumoylation of ABI5 by the *Arabidopsis* SUMO E3 ligase SIZ1 negatively regulates abscisic acid signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 5418-5423.

Molina-Torres J., Salazar-Cabrera C. J., Armenta-Salinas C. y Ramírez-Chávez E. (2004). Fungistatic and bacteriostatic activities of alkamides from *Heliopsis longipes* roots: affinities and reduced amides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 4700-4704.

Morquecho-Contreras A. y López-Bucio J. (2007). Cannabinoid-like signaling and other new developmental pathways in plants. *International Journal of Plant Developmental Biology* 1: 34-41.

Morquecho-Contreras A., Méndez-Bravo A., Pelagio-Flores R., Raya-González J., Ortiz-Castro R. y 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.

Mustilli A. C., Merlot S., Vavasseur A., Fenzi F. y Giraudat J. (2002). *Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *The Plant Cell* 14: 3089-3099.

Murashige T. y Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

Novikova G. V., Moshkov I. E., Smith A. R. y Hall M. A. (2000). The effect of ethylene on MAPKinase-like activity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 474: 29-32.

Ohme-Takagi M. y Shinshi H. (1995). Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *The Plant Cell* 7: 173-182.

Ortiz-Castro R., Contreras-Cornejo H. A., Macías-Rodríguez L. y López-Bucio J. (2009). The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior* 4: 1-12.

Ortiz-Castro R., Martínez-Trujillo M. y 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 and Environment* 31:1497-1509.

Ouaked, F., Rozhon W., Lecourieux D. y Hirt H. (2003). A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *The EMBO Journal* 22: 1282-1288.

Park S., Fung P., Nishimura N., Jensen D. R., Fujii H., Zhao Y., Lumba S., Santiago J., Rodrigues A., Chow T. F., Alfred S. M., Bonetta D., Finkelstein R., Provart N. J., Desveaux D., Rodriguez P. L., McCourt P., Zhu J., Schroeder J. I., Volkman B. F. y Cutler S. R. (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324: 1068-1071.

- Parkinson J. S. (1993).** Signal transduction schemes of bacteria. *Cell* 73: 857-871.
- Potuschak T., Lechner E., Parmentier Y., Yanagisawa S., Grava S., Koncz C. y Genschik P. (2003).** EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two *Arabidopsis* F Box proteins: EBF1 and EBF2. *Cell* 115: 679-689.
- Qiao H., Chang K. N., Yazaki J. y Ecker J. R. (2009).** Interplay between ethylene, ETP1/ETP2 F-Box proteins, and degradation of EIN2 triggers ethylene responses in *Arabidopsis*. *Genes & Development* 23: 512-521.
- Qiao H., Shen Z., Huang S.-S. C., Schmitz R. J., Urich M. A., Briggs S. P. y Ecker J. R. (2012).** Processing and subcellular trafficking of ER-tethered EIN2 control response to ethylene gas. *Science* 338: 390-393.
- Ramírez-Chávez E., López-Bucio J., Herrera-Estrella L. y Molina-Torres J. (2004).** Alkamides isolated from plants promote growth and alter root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 134: 1058-1068.
- Raghavendra A. S., Gonugunta V. K., Christmann A. y Grill E. (2010).** ABA perception and signaling. *Trends in Plant Science* 15: 395-401.
- Raduner S., Majewska A., Chen J.-Z., Xie X.-Q., Hamon J., Faller B., Altmann K.-H. y Gertsch J. (2006).** Alkylamides from *Echinacea* are a new class of cannabinomimetics. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 14192-14206.
- Rodríguez P.L., Benning G. y Grill E. (1998).** ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Federation European Biochemical Societies Letters* 421: 185-190.
- Rodríguez F. I., Esch J. J., Hall A. E., Binder B. M., Schaller G. E. y Bleecker A. B. (1999).** A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Science* 283: 996-998.
- Rosemeyer V. Michiels J., Verreth C. y Vanderleyden J. (1998).** *luxI*- and *luxR*-homologous genes of *Rhizobium etli* CNPAF512 contribute to synthesis of autoinducer molecules and nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Bacteriology* 180: 815-821.
- Saavedra X., Modrego A., Rodriguez D., Gonzalez-Garcia M. P., Sanz L., Nicolas G. y Lorenzo O. (2010).** The nuclear interactor PYL8/RCAR3 of *Fagus sylvatica* FsPP2C1 is a

positive regulator of abscisic acid signaling in seeds and stress. *Plant Physiology* 152: 133-150.

Santiago J., Rodrigues A., Saez A., Rubio S., Antoni R., Dupeux F., Park S. Y., Márquez J. A., Cutler S. R. y Rodrigues P. L. (2009). Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. *The Plant Journal* 60: 575-578.

Santner A., Calderon-Villalobos L. I. A. y Estelle M. (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology* 5: 301-307.

Schaller G. E. y Bleecker A. B. (1995). Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the *Arabidopsis ETR1* gene. *Science* 270: 1809-1811.

Schaller G. E. y Kieber J. J. (2002). Ethylene. *The Arabidopsis Book* 1: 1-18.

Schaller G. E., Ladd A. N., Lanahan M. B., Spanbauer J. M. y Bleecker A. B. (1995). The ethylene response mediator ETR1 from *Arabidopsis* forms a disulfide-linked dimer. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 12526-12530.

Scheres B., Benfey P. y Dolan L. (2002). Root development. *The Arabidopsis Book* 1: 1-18.

Schiefelbein J. W. (2000). Constructing a plant cell. The genetic control of root hair development. *Plant Physiology* 124: 1525-1531.

Schiefelbein J. W., Masucci J. D. y Wang H. (1997). Building a root: the control of patterning and morphogenesis during root development. *The Plant Cell* 9: 1089-1098.

Schneider K., Wells B., Dolan L. y Roberts K. (1997). Structural and genetic analysis of epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* primary roots. *Development* 124: 1789-1798.

Sharma A., Sahgal M. y Johri B. N. (2003). Microbial communication in the rhizosphere: operation of quorum sensing. *Current Science* 85: 1164-1171.

Sharp R. E., LeNoble E. M., Else M. A., Thorne E. T. y Gherardi F. (2000). Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: evidence for an interaction with ethylene. *Journal of Experimental Botany* 51: 1575-1584.

Siegel R.S., Xue S., Murata Y., Yang Y., Nishimura N., Wang A. y Schroeder J. I. (2009). Calcium elevation-dependent and attenuated resting calcium-dependent abscisic acid induction of stomatal closure and abscisic acid-induced enhancement of calcium sensitivities of S type anion and inward-rectifying K⁺ channels in *Arabidopsis* guard cells. *The Plant Journal* 59: 207-220.

Smith S. y De Smet I. (2012). Root system architecture: insights from *Arabidopsis* and cereal crops. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 367:1441-1452.

Söderman E. V., Brocard I. M., Lynch T. M. y Finkelstein R. R. (2000). Regulation and function of the *Arabidopsis ABA-insensitive4* gene in seed and abscisic acid response signaling networks. *Plant Physiology* 124: 1752-1765.

Solano R., Stepanova A., Chao Q. y Ecker J. R. (1998). Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE 3 and ETHYLENE RESPONSE-FACTOR 1. *Genes and Development* 12: 3703-3714.

Suárez-López P. (2005). Long-range signaling in plant reproductive development. *International Journal of Developmental Biology* 49: 761-771.

Subbiah V. y Reddy K. J. (2010). Interactions between ethylene, abscisic acid and cytokinin during germination and seedling establishment in *Arabidopsis*. *Journal of Biosciences* 35: 451-458.

Swarup K., Benková E., Swarup R., Casimiro I., Péret B., Yang Y., Parry G., Nielsen E., De Smet I., Vanneste S., Levesque M. P., Carrier D., James N., Calvo V., Ljung K., Kramer E., Roberts R., Graham N., Marillonnet S., Patel K., Jones J. D. G., Taylor C. G., Schachtman D. P., May S., Sandberg G., Benfey P., Friml J., Kerr I., Beeckman T., Laplaze L. y Bennett M. J. (2008). The auxin influx carrier LAX3 promote lateral root emergence. *Nature Cell Biology* 10: 946-954.

Teaster N. D., Montes C. M., Tang Y., Wiant W. C., Cotter M. Q., Wang Y.-S., Kilaru A., Venables B. J., Hasenstein K. H., Gonzalez G., Blancaflor E. B. y Chapman K. D. (2007). *N*-Acylethanolamine Metabolism interacts with abscisic acid signaling in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *The Plant Cell* 19: 2454-2469.

Thomine S., Wang R., Ward J. M., Crawford N. M. y Schroeder J. I. (2000). Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 4991-6.

Umezawa T., Sugiyama N., Mizoguchi M., Hayashi S., Myouga F., Yamaguchi-Shinozaki K., Ishihama Y., Hirayama T. y Shinozaki K. (2009). Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 17588-17593.

Umezawa T., Nakashima K., Miyakawa T., Kuromori T., Tonakura M., Shinozaki K. y Yamaguchi-Shinozaki K. (2010). Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. *Plant Cell Physiology* 51: 1821-1839.

Vanstraelen M. y Benková E. (2012). Hormonal interactions in the regulation of plant development. *The Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28: 463-487.

Vlad F., Rubio S., Rodrigues A., Sirichandra C., Belin C., Robert N., Leung J., Rodriguez P. L., Laurière C. y Merlota S. (2009). Protein phosphatases 2C regulates the activation of the Snf1-related kinase OST1 by abscisic acid in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 21: 3170-3184.

Wada T., Tachibana T., Shimura Y. y Okada K. (1997). Epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* determined by a *Myb* homolog, *CPC*. *Science* 277: 1113-1116.

Wang Y. H. e Irving H. R. (2011). Developing a model of plant hormone interactions. *Plant Signal & Behavior* 6: 494-500.

Wang Y., Liu C., Li K., Sun F., Li X., Zhao Y., Han C., Zhang W., Duan Y., Liu M. y Li X. (2007). *Arabidopsis EIN2* modulates stress response through abscisic acid response pathway. *Plant Molecular Biology* 64: 633-644.

Wang Y.-S., Shrestha R., Kilaru A., Wiant W., Venables B. J., Chapman K. D. y Blancaflor E. B. (2006). Manipulation of *Arabidopsis* fatty acid amide hydrolase expression modifies plant growth and sensitivity to *N*-acylethanolamines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 12197-12202.

Waters C. M. y Bassler B. L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *The Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21: 319-346.

Yamaguchi-Shinozaki K. y Shinozaki K. (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology* 57: 781-803.

Yoshida R., Hobo T., Ichimura K., Mizoguchi T., Takahashi F., Aronso J., Ecker J. R. y Shinozaki K. (2002). ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology* 43: 1473-1483.

Zhao Q. y Guo H.-W. (2011). Paradigms and paradox in the ethylene signaling pathway and interaction network. *Molecular Plant* 4: 626-634.

Zhu S. Y., Yu X. C., Wang X. J., Zhao R., Li Y., Fan R. C., Shang Y., Du S. Y., Wang X. F., Wu F. Q., Xu Y. H., Zhang X. Y. y Zhang D. P. (2007). Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 19: 3019-3036.

11. APÉNDICE

Publicación relacionada con este trabajo:

Barrera-Ortiz S., Ortiz-Castro R., López-Bucio J. y Beltrán Peña E. (2012). Bases Moleculares de la señalización del ácido abscísico y el etileno en plantas. *Ciencia Nicolaita* 56: 20-34.

Publicación efectuada durante la realización de este trabajo:

Santoyo Pizano G., Abad M., **Barrera S.**, Farías L., González O., Muñoz E., Olivo M., Rodríguez S., Santillán R. y Valle M. (2012). Extremófilos: microorganismos viviendo al límite. *Saber Más* 2: 4-5.

Bases moleculares de la señalización del ácido abscísico y el etileno en plantas

Salvador Barrera-Ortiz, Randy Ortiz-Castro, José López-Bucio y Elda Beltrán-Peña

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. UMSNH.

Resumen

Los reguladores del crecimiento son moléculas fundamentales en la modulación de diversos procesos del desarrollo de las plantas, incluyendo la germinación, la senescencia, la arquitectura de la raíz y del follaje y las respuestas a factores bióticos y abióticos. Evidencia reciente indica que el ácido abscísico (ABA) y el etileno interactúan antagonicamente en varios de estos procesos mediante la participación de proteínas involucradas tanto en la biosíntesis como en la señalización de cada regulador. En tal interacción, juegan un papel relevante algunas enzimas como la ACC sintasa y ACC oxidasa que participan en la biosíntesis de etileno, así como las proteínas ETR1 y EIN2 de su ruta de señalización. Por otra parte, las proteínas NCED y ABA2 son importantes en las respuestas celulares al ácido abscísico. Los mecanismos moleculares implicados en las interacciones de ambas hormonas se desconocen, no obstante, la caracterización a nivel genético o mediante técnicas de química analítica, farmacológicas y moleculares ha empezado a aportar información valiosa para entender su funcionalidad en los diferentes tejidos. En este trabajo se discuten los avances recientes en las vías de señalización del ABA y del etileno, con énfasis especial en la interacción entre ambas fitohormonas y su efecto sobre los procesos de organogénesis.

Palabras clave: Ácido abscísico, etileno, desarrollo vegetal, *Arabidopsis thaliana*.

Abstract

Plant growth regulating substances are fundamental in modulating diverse developmental processes in plants, including germination, senescence, root and shoot architecture and responses to biotic and abiotic factors. Recent evidence indicates that abscisic acid (ABA) and ethylene interact antagonistically in various of these processes through the participation of proteins involved in the biosynthesis and/or response to each regulator. In such interaction, the enzymes ACC synthase and ACC oxidase that participate in ethylene biosynthesis, as well as the ETR1 and EIN2 proteins belonging to the ethylene signaling pathway, play essential roles. On the other hand, the NCED and ABA2 proteins are important for cellular responses to ABA. Little is known about the mechanisms of ethylene-ABA interactions. However, genetic characterization of each pathway, analytic chemistry, pharmacology and molecular analysis, have started to provide information towards understanding their functional relevance in plant tissues. In this work, recent advances in ABA and ethylene signaling are discussed, with special emphasis on the interaction between both phytohormones and its effect on organogenesis processes.

Key words: Abscisic acid, ethylene, plant development, *Arabidopsis thaliana*.

Introducción

Las fitohormonas, también conocidas como reguladores del crecimiento vegetal, modulan el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Entre ellas, las auxinas, citocininas, giberelinas, etileno, ácido abscísico, ácido jasmónico, ácido salicílico y brasinoesteroides han sido ampliamente estudiadas.

El ácido abscísico (ABA), además de regular la maduración y latencia de las semillas juega un papel crítico en la respuesta a sequía y salinidad, acumulándose en las células vegetales bajo estrés hídrico donde promueve el cierre estomático y regula la expresión de una gran cantidad de genes (Hirayama y Shinozaki 2007; Umezawa et al., 2010). Diversas investigaciones sobre el ABA llevaron a proponer un modelo complejo de señalización, donde se sugería como sus posibles receptores a proteínas enlazadas a las proteínas G (GCR2, GTG1/2) y no explicaba de qué forma estas últimas podrían regular las respuestas al ABA en plantas (Pandey et al., 2009). En años recientes, se ha podido establecer la ruta involucrada al descubrir un nuevo tipo de receptor de ABA, formado por las proteínas PYR/PYL/RCAR (Ma et al., 2009; Park et al., 2009), que se unen al complejo proteico fosfatasa-cinasa (PP2C-SnRK2). En presencia del ABA, la actividad de la fosfatasa se bloquea, quedando así las cinasas SnRK2 activas (Umezawa et al., 2009; Vlad et al., 2009).

Por otra parte, la participación del etileno como regulador del envejecimiento, la maduración de los frutos y la respuesta a patógenos es bien conocida. El etileno fue una de las fitohormonas descubiertas a finales del siglo XX, período en el que se documentó que el gas producido de emanaciones durante la extracción de la hulla causaba envejecimiento pre-

turo y abscisión de las hojas de las plantas (Abeles et al., 1992). Neljubov en 1901 identificó al etileno como el componente “activo” de dichas emanaciones y posteriormente se demostró que las plantas lo producen de manera natural, estableciéndose de esta manera que el etileno es un regulador endógeno del crecimiento y desarrollo vegetal (Schaller y Kieber, 2002). Las investigaciones con *Arabidopsis thaliana* han permitido identificar diversos componentes de la ruta de transducción de señales del etileno, incluyendo cuatro receptores membranales, intermediarios de la vía y dos familias de factores de transcripción.

Por su carácter antagónico en el desarrollo vegetal, donde el etileno promueve la senescencia y el ABA induce la germinación, se ha propuesto que estas dos fitohormonas interactúan en la modulación de procesos fisiológicos de crecimiento y desarrollo de las plantas. Este artículo resume los avances recientes sobre los componentes de las vías de señalización del ABA y del etileno, así como la relación antagónica entre ambos fitoreguladores y su efecto sobre la fisiología vegetal.

Ruta de señalización del ABA

Hasta hace unos pocos años no se tenía definido el mecanismo de respuesta al ABA en plantas. Park y colaboradores (2009), examinaron minuciosamente bibliotecas químicas y observaron que la “pirabactina” funciona como un agonista selectivo del ABA. Después de un escrutinio genético contra la pirabactina, se identificó al gen *PYRABACTIN RESISTANCE1* (*PYR1*). Otro grupo de investigadores, en un escrutinio de doble híbrido de levadura aislaron una proteína que interactúa con ABI1, a la cual denominaron *REGULATORY COMPONENT ABA RECEPTOR1* (*RCAR1*) (Ma et al., 2009). Posteriormente, en el genoma de *Arabidopsis* se identificó que *PYR* y *RCAR* corresponden a la misma familia de genes formada por 14 miembros, los cuales se conocen como *PYR1* y parecidos a *PYR1* (*PYL*) 1-13 o *RCAR1-RCAR14* (Umezawa et al., 2010). También se reportó que las proteínas *PYR/PYL/RCAR* podían unirse al ABA e interactuar con las fosfatasa de la familia 2C (PP2C) del grupo A, inhibiendo así la actividad de las PP2C. Los resultados antes mencionados permitieron sugerir que las *PYR/PYL/RCARs* funcionan como una subunidad reguladora negativa de las PP2C (Ma et al., 2009; Park et al., 2009). Debido a que las fosfatasas PP2C modulan negativamente la señalización de ABA, se propuso que la unión de *PYR/PYL/RCAR* al ABA activa su vía de señalización. La función de las distintas *PYR/PYL/RCARs* se confirmó por la insensibilidad al ABA de la mutante cuádruple *pyr1 pyl1 pyl2 pyl3* (Park et al., 2009) y, en forma contrastante, cuando se sobre-expresaron las proteínas *RCAR1/PYL9*, *RCAR3/PYL8* o *RCAR8/PYL5* en *Arabidopsis* se produjo hipersensibilidad al ABA y elevada tolerancia a la sequía (Ma et al., 2009; Santiago et al., 2009; Saavedra et al., 2010).

En complemento, en un escrutinio genético para aislar mutantes de *Arabidopsis* insensibles al ABA, se identificaron dos genes: *ABA-INSENSITIVE1* (*ABI1*) y *ABI2*, que codifican las fosfatasas PP2C (Leung et al., 1994; Meyer et al., 1994; Leung et al., 1997; Rodríguez et al., 1998). Se observó que las mutantes *abi1-1* y *abi2-1* eran insensibles al ABA

en varios tejidos y en diferentes etapas de desarrollo, sugiriendo con ello que las fosfatasa PP2C actúan como reguladores globales de la señalización del ABA. Recientemente, se determinó que la mutante de la fosfatasa PP2C, *abi1-1* es incapaz de interactuar con los receptores PYR/PYL/RCAR, lo que causa que dichos receptores no puedan inactivar a las fosfatasas que mantienen la vía apagada (Ma et al., 2009; Park et al., 2009).

La identificación y caracterización de las fosfatasas PP2C ha mostrado la importancia de los eventos de fosforilación en la señalización del ABA, donde varias cinasas han sido aisladas y tipificadas como componentes de esta vía (Hirayama y Shinozaki, 2007). Entre ellas, existen 10 cinasas SnRK2, designadas en *Arabidopsis* como SnRK2.1-SnRK2.10 (Hrabak et al., 2003) o SRK2A-SRK2J (Yoshida et al., 2002). Las cinasas SnRK2/SRK2 son desfosforiladas eficientemente por las fosfatasas tipo ABI1, inactivándolas (Umezawa et al.,

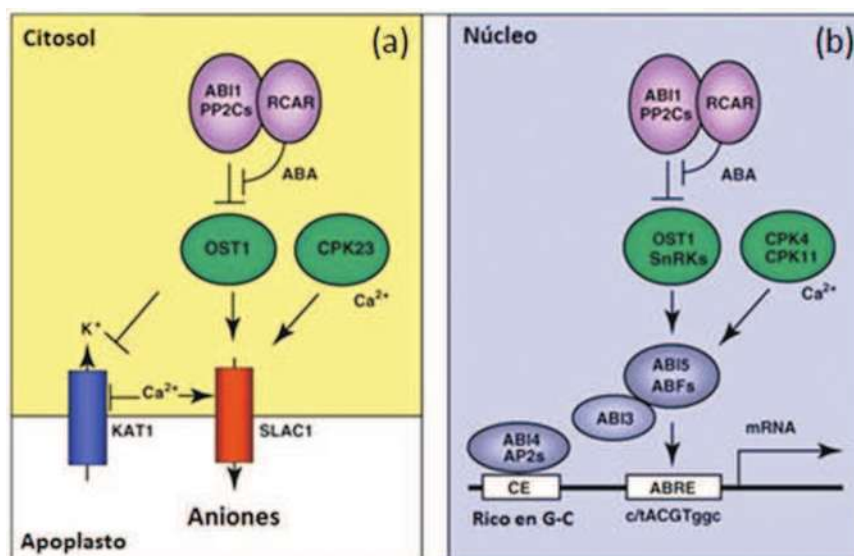


Figura 1. La señalización de ABA. El receptor de ABA está formado por el complejo heteromérico de una PP2C como ABI1 y una proteína de unión al ABA, RCAR (ambas en color rosa). El complejo receptor controla la señalización del ABA tanto en el citosol (a) como en el núcleo (b). La actividad fosfatasa de las PP2C inhibe la acción de la cinasa citosólica, OST1, y la nuclear, SnRKs (presentadas en verde) y posiblemente de las CPKs dependientes de Ca²⁺ como la CPK23. En presencia de ABA, la actividad fosfatasa del receptor es bloqueada. Como consecuencia, las cinasas son liberadas de la inhibición y quedan activas para regular a los blancos clave de la ruta de señalización de ABA. En las células guarda, las proteínas blanco son los canales iónicos SLAC1 y KAT1, los cuales son activados e inhibidos, respectivamente, por la acción de OST1. En el núcleo, los blancos son ABI5 y ABFs, factores de transcripción tipo cierre de leucina básico. Las ABFs fosforiladas y unidas como dímeros se enlazan a los elementos cis de respuesta a ABA (ABRE), promoviendo la expresión de los genes de respuesta a ABA y, en forma concertada con otros factores transcripcionales como ABI3, ABI4 y AP2s, inducen la expresión de genes de respuesta a ABA (los componentes son presentados en azul acero). ABI3 se une a ABI5 y aumenta su actividad, mientras que ABI4 y factores de transcripción tipo AP2 se unen al elemento CE rico en G-C para regular en forma óptima la expresión de genes dependientes de ABA (Modificado de Raghavendra et al., 2010).

2009; Vlad et al., 2009). En este tópico, Vlad y colaboradores (2009) identificaron a la serina 175 en la cinasa SRK2E/OST1 como el sitio blanco de las fosfatasa, lo cual proporcionó una evidencia fuerte de que dichas enzimas inactivan a las cinasas SnRK2. Finalmente, al reconstituir *in vitro* los componentes de la vía, se demostró que los receptores PYR/PYL/RCAR se unen e inactivan a las PP2C, impidiendo la desfosforilación de las cinasas SnRK2 de una forma dependiente del ABA (Umezawa et al., 2009).

Con relación a las cinasas SnRK2/SRK2, se ha reportado que pueden activar o inactivan canales iónicos de la membrana plasmática, o bien pueden afectar factores de transcripción en el núcleo. Por ejemplo, OST1/SRK2E actúa como regulador positivo del cierre de estomas (Mustilli et al., 2002), activando los canales aniónicos SLAC1 e inhibiendo a los canales catiónicos KAT1 (Fig. 1a) (Geiger et al., 2009; Lee et al., 2009). Ambos canales son regulados por la ruta de señalización del ABA y Ca^{2+} (Siegel et al., 2009). Se ha sugerido que la regulación dependiente de Ca^{2+} probablemente se debe a la estimulación de SLAC1 por la cinasa CPK23 (Fig. 1a) (Geiger et al., 2010).

Los reguladores transcripcionales clave en la expresión de genes dependientes de ABA son los factores de unión a elementos de respuesta a ABA -ABRE- (ABFs), del tipo cierre de leucina de región básica (bZIP) con ABI5 como un representante típico (Choi et al., 2005; Finkelstein et al., 2005). La fosforilación de este último por las SnRKs conduce a su activación, mientras que la sumoilación a través del marcaje de ABI5 con ubiquitina por una SUMO E3 ligasa para su degradación en el proteosoma, antagoniza la acción de ABI5 (Miyara et al., 2009). ABI5 y otros ABFs son también fosforilados por las cinasas CPK4 y CPK11 dependientes de Ca^{2+} (Zhu et al., 2007). Otros factores de transcripción que contribuyen a la especificidad del ABA, como el ABI3 (reguladores tipo B3), se unen a ABI5 e incrementan su actividad. Además, ABI4 (factor transcripcional tipo AP2) y factores adicionales que incluyen a las MYC/MYB actúan también como reguladores positivos de respuesta al ABA (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006). La heterodimerización de ABI3 con ABI5 y su interacción con la caja ABRE, además de la unión de ABI4 con los elementos ricos en G-C en los promotores de los genes de respuesta a ABA, permiten la transcripción inducible de estos genes (Fig. 1b) (Raghavendra et al., 2010).

Vía de señalización del etileno

Para dilucidar la vía de transducción de señales del etileno se requirió del aislamiento de mutantes afectadas de los intermediarios que la integran. Cabe mencionar que la obtención de dichas mutantes en *Arabidopsis* ha dependido casi exclusivamente del fenotipo en la respuesta triple que se presenta cuando las plántulas mutantes crecen en la oscuridad (Knight et al., 1910). Dicho fenotipo se caracteriza por la presencia de hipocotilos cortos y gruesos, la inhibición de la elongación de los hipocotilos y la formación de un gancho apical (Guzmán y Ecker, 1990) que contrasta con el fenotipo etiolado: crecimiento preferencial del hipocotilo en la oscuridad, observado en las plántulas silvestres (Wt) expuestas al aire (Fig. 2). Las mutaciones aisladas a través del fenotipo alterado en la respuesta al etileno pertene-

cen a dos grupos: i) insensibles y ii) de respuesta constitutiva al etileno. Un ejemplo de las primeras es la mutante *etr1-1*, que presenta ganancia de la función en un receptor (Bleecker et al., 1988; Chang et al., 1993) y *ein2*, con pérdida de la función en un elemento de la vía de señalización (Alonso et al., 1999). Mientras que las mutantes de respuesta constitutiva a etileno mostraron el fenotipo de hipersensibilidad a etileno, tanto cuando crecen en aire como en etileno; un ejemplo de ellas son las *eto3* (*ethylene overproducer3*) con una sobreproducción de etileno (Guzmán y Ecker, 1990). Alternativamente, también existen mutaciones en la ruta de transducción de señales como la *ctr1* que da como resultado la pérdida de la función del regulador negativo de la vía de señalización manteniendo constitutivamente activada la respuesta celular a etileno (Fig. 2) (Kieber et al., 1993).

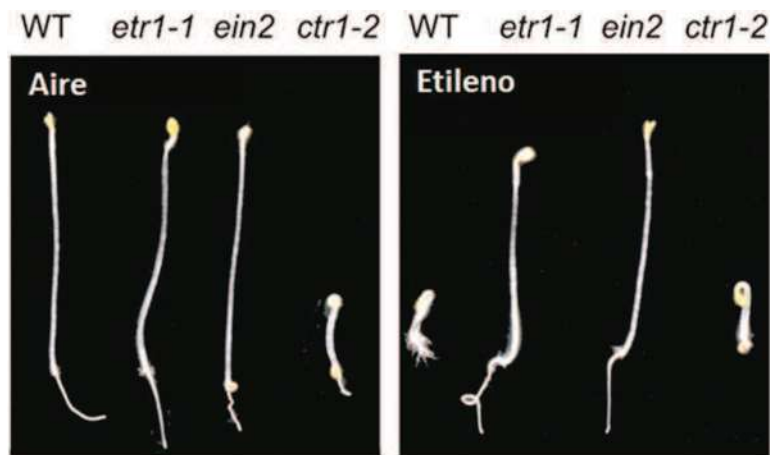


Figura 2. Mutantes de la ruta de transducción de señales del etileno. El efecto del etileno sobre la inducción de la respuesta triple en plántulas que crecen en la oscuridad para el tipo silvestre (Wt) y las mutantes insensibles a etileno *etr1-1* y *ein2* y de respuesta constitutiva al etileno *ctr1-2* (Modificado de Schaller y Kieber, 2002).

La cascada de señalización de etileno descrita hasta la fecha consta de cuatro componentes clave: el receptor ETR1, el regulador negativo de la ruta CTR1, el intermediario EIN2 y el factor de transcripción EIN3. Existen otras proteínas que pueden realizar la misma función debido a su alta similitud con los componentes de la ruta de etileno; tal es el caso de ETR2, ERS1, ERS2 y EIN4 que también funcionan como receptores, o EIL1, EIL2, EIL3 y ERFs, que lo hacen como factores de transcripción (Fig. 3).

ETR1 es una proteína de 738 aminoácidos del retículo endoplásmico que presenta tres dominios transmembranales, que comprenden el sitio de unión a etileno donde, al parecer, la unidad funcional de percepción de etileno es un dímero (Schaller et al., 1995). En la activación de dicho receptor se ha comprobado químicamente la actividad histidina cinasa, que implica la autofosforilación de la proteína en un residuo conservado de histidina, con la posterior transferencia de ese grupo fosfato a un residuo de ácido aspártico dentro de un do-

minio receptor (Gamble et al., 1998). Dicha actividad es típica de sistemas bacterianos de dos componentes, lo que sugiere que podría haberse heredado cuando se llevó a cabo la simbiosis que condujo al origen de los cloroplastos (Parkinson, 1993). La unión de alta afinidad del etileno está mediada por un cofactor de cobre coordinado por dos aminoácidos conservados (Cis65 e His69) (Schaller y Bleecker, 1995; Rodríguez et al., 1999). La unión del etileno al receptor ETR1 lo activa y le permite la interacción y activación de la proteína CTR1 (Clark et al., 1998).

El gen *CTR1* codifica una proteína de 821 aminoácidos, donde la mitad carboxilo terminal presenta un dominio similar al de la familia Raf de las cinasas serina/treonina. Estas últimas participan en la cascada de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) en animales, la cual consta de varias *MAPK* cinasa cinasa (MAPKKK) que fosforilan y activan a las MAPK cinasas (MAPKK), las cuales a su vez activan a las MAPK que transmitirán la señal fosforilando a sus blancos (Ichimura et al., 2000). Se ha sugerido que *CTR1* podría funcionar como una MAPKKK en forma análoga a las proteínas Raf, e iniciar la señalización a través de la cascada MAPK en *Arabidopsis*, lo que culminaría con la inactivación de *EIN2* (Novikova et al., 2000; Ouaked et al., 2003). Así, las mutaciones en *CTR1* que afectan su actividad provocan un fenotipo de respuesta constitutiva a etileno (Kieber et al., 1993). *EIN2* codifica una proteína integral de membrana de 1294 aminoácidos que contiene 12 dominios transmembranales y en la región amino terminal presenta una alta similitud con la familia de transportadores de cationes Nramp (Alonso et al., 1999). La región amino terminal es transmembranal. Las mutantes *ein2* exhiben el fenotipo insensible a

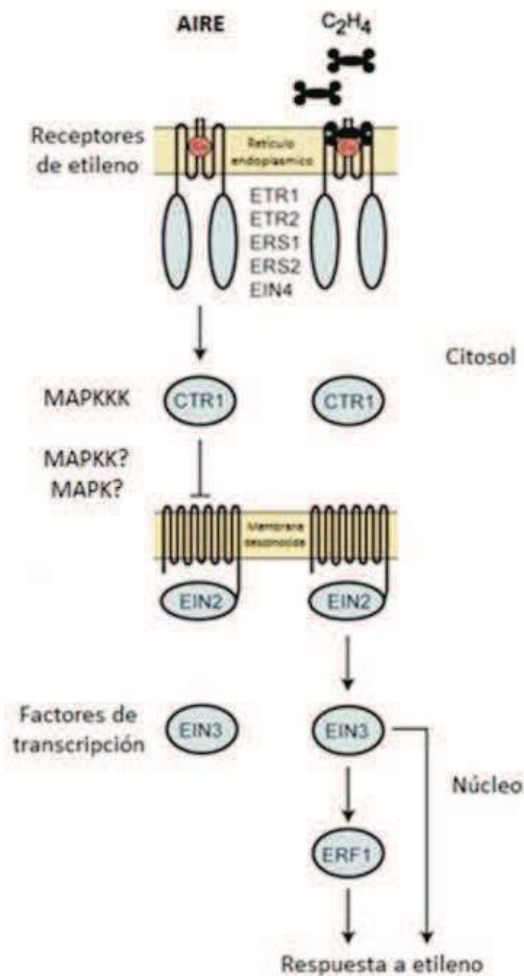


Figura 3. Modelo para la transducción de señales del etileno. En aire, los receptores del etileno mantienen a la cinasa CTR1 en estado inactivo, reprimiendo las respuestas a etileno, mientras que en etileno, la represión es liberada. La unión del etileno inactiva los receptores y por lo tanto a CTR1. Como resultado, EIN2 se activa encendiendo así la cascada que involucra a los factores de transcripción EIN3/EILs y ERFs, los cuales participan en la regulación de las respuestas al etileno. Los dominios solubles de las proteínas se muestran como círculos y las estructuras transmembranales predichas para los receptores de etileno y EIN2 se presentan como líneas que atraviesan la membrana (Modificado de Schaller y Kieber, 2002).

etileno más fuerte que el resto de las mutantes resistentes a etileno aisladas en *Arabidopsis*, lo que corrobora su papel crítico en la señalización. Los experimentos para demostrar la posible actividad de transportador de metales de EIN2 de plantas en sistemas heterólogos, mostraron que EIN2 de *Arabidopsis* no complementa cepas de levaduras deficientes en canales de metales (Thomine et al., 2000).

Por otra parte, corriente abajo de EIN2 se ha reportado una proteína blanco de 628 aminoácidos, conocida como EIN3, con características de factor de transcripción (Chao et al., 1997). EIN3 se encuentra en el núcleo y presenta dominios ácidos ricos en prolina y glutamina. Las mutaciones con pérdida de función para EIN3 presentan un fenotipo insensible a etileno, lo que sugiere que funciona como un regulador positivo de la transducción de señales del etileno. EIN3 es miembro de una familia que contiene al menos otras tres proteínas parecidas a EIN3 (EILs -EIN3-like) (Chao et al., 1997), las cuales se unen como homodímeros a un elemento promotor en el gen ERF1 promoviendo su transcripción (Solano et al., 1998). Los ERFs son también factores de transcripción que inducen la expresión de genes relacionados a la patogénesis, como la β -1-3-glucanasa, la quitinasa básica y la defensina (Ohme-Takagi y Shinshi, 1995; Solano et al., 1998). De esta manera, EIN3 y los EILs estimulan la transcripción de genes de respuesta a etileno y de otros factores de transcripción como los ERFs; estos últimos a su vez también promueven la transcripción de miembros de su misma familia, sugiriendo la existencia de una compleja red de regulación transcripcional en la ruta de señalización del etileno (Solano et al., 1998).

Relación antagónica entre el ABA y el etileno

La interacción entre ABA y etileno en las plantas se ha caracterizado a distintos niveles. Por ejemplo, existe un reporte que muestra que las mutantes deficientes de ABA, *flacca* y *notabilis* de tomate, contienen más del doble de etileno que las plantas silvestres (Sharp et al., 2000). Las mutantes *flacca* y *notabilis* presentan tamaño pequeño, biomasa reducida, tallo corto, hojas pequeñas y formación de raíces adventicias comparadas con plantas normales, las cuales son características típicas de una respuesta aumentada al etileno. También se observó que el tratamiento de dichas mutantes con tiosulfato de plata, un inhibidor de la acción del etileno, restaura parcialmente el crecimiento del follaje en las mutantes mencionadas. Esta información sugiere que el efecto causado por la deficiencia de ABA en el follaje puede ser atribuido a una sobreproducción de etileno (Sharp et al., 2000). Respecto al efecto de la alteración en la señalización del etileno, se ha reportado que las mutaciones con pérdida de la función en el gen *EIN2* muestran un incremento en la producción de ABA en *Arabidopsis* (Ghassemian et al., 2000; Wang et al. 2007; Cheng et al., 2009). Además, se ha observado que las mutaciones en *CTR1*, que inducen una respuesta constitutiva a etileno, y la *EIN2*, que provoca insensibilidad a etileno, aumentan o suprimen respectivamente el fenotipo de resistencia a la germinación de la mutante de *Arabidopsis abi1* cuando se suplementa con ABA de manera exógena (Beaudoin et al., 2000). Sin embargo, la mutación en *EIN2* no mostró un efecto supresor significativo en las mutantes *abi3* bajo las mismas condi-

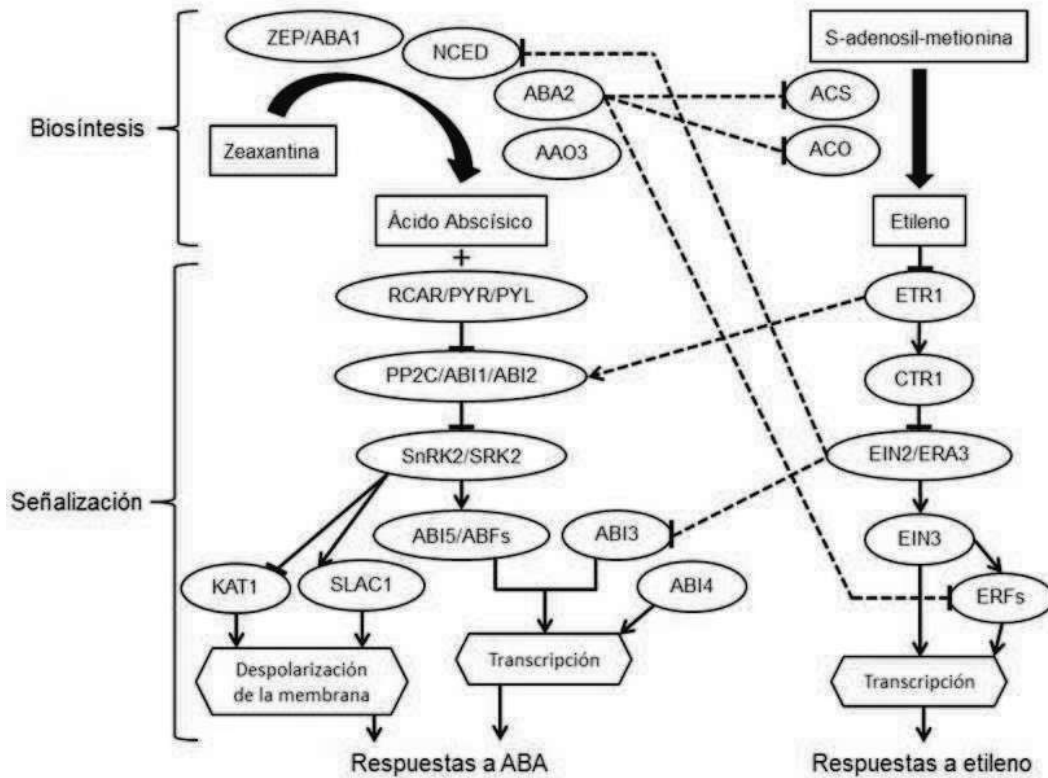


Figura 4. La interacción ABA-etileno implica a la vía de biosíntesis y señalización de ambas fitohormonas. Los componentes dentro de óvalos representan proteínas y dentro de rectángulos representan metabolitos, en tanto que los elementos delimitados por hexágonos muestran respuestas celulares. Las líneas continuas señalan procesos establecidos en tanto que las discontinuas indican los procesos para la interacción propuestos. La punta de flecha al final de las líneas indica la activación o promoción en tanto que la línea perpendicular señala la inactivación.

ciones (Beaudoin et al., 2000). Lo anterior indica que la cascada de señalización del etileno definida por ETR1, CTR1 y EIN2 inhibe la señalización de ABA probablemente cascada arriba del factor transcripcional ABI3 durante la germinación de la semilla. Otras evidencias de la interacción etileno y ABA provienen del análisis de las mutaciones que aumentan la producción de etileno en las mutantes *eto3* que presentan sensibilidad reducida a ABA durante la germinación (Subbiah y Reddy, 2010). Además, se ha observado que la aplicación del precursor de etileno ácido 1-amino-1-ciclopropano (ACC) reduce el efecto inhibitorio sobre la germinación en plantas silvestres de *Arabidopsis*; los análisis bioquímicos y moleculares identificaron a una mutante designada como *enhancer response to ABA3 (era3)*, la cual incrementó la sensibilidad a ABA en las semillas y acumuló ABA, sugiriendo que este gen es un regulador negativo de la biosíntesis de ABA (Ghassemian et al., 2000). Análisis genéti-

cos posteriores realizados por este mismo grupo, mostraron que *ERA3* representa un nuevo alelo en el locus *ETHYLENE INSENSITIVE2 (EIN2)*. Debido a que mutaciones que afectan la señalización de etileno modifican también los niveles de ABA y que mutaciones en la síntesis de ABA alteran la cantidad de etileno, un análisis de la expresión global de genes por microarreglos mostró que la mutación en *ABA2*, gen que codifica una enzima implicada en la biosíntesis del ABA, regula positivamente la expresión de los genes de biosíntesis del etileno ACO (ACC oxidasa) y el factor de transcripción de respuesta a etileno ERF053, mientras que el gen *9-CIS-EPOXICAROTENOID DIOXYGENASE 3 (NCED3)* que codifica una enzima de la biosíntesis de ABA fue regulada negativamente en la mutante *ein2*. Además, también se observó que la mutación en el gen *ETR1* disminuye la expresión de los genes *ABSCISIC ACID INSENSITIVE1 (ABI1)* y *CYP70742*, este último implicado en el catabolismo de ABA (Cheng et al., 2009). Los datos antes mencionados sugieren que el ABA y el etileno pueden controlar la biosíntesis, el catabolismo y la señalización hormonal, aumentando así sus efectos antagónicos en las plantas (Fig. 4).

Cabe mencionar que también se han reportado efectos distintos a una interacción netamente antagónica, por ejemplo, Zhang y col. (2009) observaron que en frutos de tomate el ABA induce la biosíntesis de etileno cuando se aplica de manera exógena a través del incremento en la expresión los genes que codifican para la ACC sintasa y la ACC oxidasa. Por otra parte, se ha observado que la aplicación exógena de auxinas incrementa la biosíntesis de etileno y la producción de ABA culminando con la inhibición del crecimiento en *Galium aparine* (Hansen y Grossmann, 2000). Finalmente, existen datos donde la adición de la citocinina *N-6-benzil-adenina (BA)* revirtió la sensibilidad incrementada de resistencia a la germinación de las mutantes insensibles a etileno tratadas con ABA (Subbiah y Reddy, 2010). Estos últimos reportes sugieren la participación de otras hormonas en la regulación de procesos que implican la interacción ABA-etileno.

Conclusiones

La interacción del ABA-etileno modula el crecimiento y desarrollo de las plantas de una manera antagónica, donde cada una de estas fitohormonas puede regular la concentración de la otra. De esta forma, cuando una de las dos hormonas pierde o incrementa la capacidad de ejercer su efecto en la planta, el cambio fenotípico observado es el resultado de la alteración de la señal de ambas hormonas, ya que éstas se regulan entre sí. La mayoría de las evidencias de la interacción ABA-etileno presentadas en esta revisión muestran que la regulación principal se efectúa a través de la vía de biosíntesis de ambas hormonas, en la que el gen *EIN2* juega un papel fundamental. Además de la modulación transcripcional reportada, el hecho de que ambas rutas de señalización utilizan cascadas de fosforilación para transmitir la señal abre la posibilidad de una regulación post-transcripcional entre ellas. Como se mencionó anteriormente, existen reportes en los cuales la interacción entre el ABA y el etileno no es netamente antagónica; cabe destacar que dichos resultados provienen de análisis realizados en órganos específicos, lo cual no representaría un mecanismo de ac-

ción general sobre la planta. Además, la participación de otras hormonas, como las auxinas o citocininas, incrementa el número de variables ocasionando una interacción aún más compleja. La participación de las auxinas o las citocininas en la interacción ABA-etileno sugiere la existencia de redes de señalización que interactúan constantemente para lograr un crecimiento y desarrollo adecuado en los organismos vegetales.

En nuestro grupo de trabajo estamos caracterizando las respuestas que modifican la arquitectura radicular por efecto del suplemento exógeno de ABA y etileno a mutantes de *A. thaliana* sencillas y dobles en los componentes de las rutas de señalización del ABA y etileno para identificar a nivel genético los nodos de interacción entre ambas vías. Asimismo, la determinación de la actividad histoquímica en mutantes de la ruta de señalización del etileno llevando la línea transgénica con la secuencia que codifica la β -glucuronidasa fusionada a la región promotora del gen *ABI4* de la vía de señalización del ABA, permitirán la identificación de un posible mecanismo a través del cual las dos rutas de señalización interactúan. También, la cuantificación del ABA en mutantes de la vía de señalización del etileno permitirá identificar los elementos de esta ruta que modifican la producción de ABA.

Referencias

- Abeles F. B.**, P. W. Morgan y Jr. M. E. Saltveit (1992) Ethylene in Plant Biology. 2nd Edition (San Diego: Academic Press).
- Alonso J. M.**, T. Hirayama, G. Roman, S. Nourizadehy y J. R. Ecker (1999) EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. Science 284: 2148-2152.
- Beaudoin N.**, C. Serizet, F. Gosti y J. Giraudat (2000) Interactions between Abscisic and Ethylene Signaling Cascades. The Plant Cell 12: 1103-1115.
- Bleecker A. B.**, M. A. Estelle, C. Somerville y H. Kende (1988) Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. Science 241: 1086-1089.
- Chang C.**, S. F. Kwok, A. B. Bleecker y E. M. Meyerowitz (1993) *Arabidopsis* ethylene response gene *ETR1*: Similarity of product to two-component regulators. Science 262: 539-544.
- Chao Q.**, M. Rothenberg, R. Solano, G. Roman, W. Terzaghi y J. R. Ecker (1997) Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. Cell 89: 1133-44.
- Cheng W. H.**, M. H. Chiang, S. G. Hwang y P. C. Lin (2009) Antagonism between abscisic acid and ethylene in *Arabidopsis* acts in parallel with the reciprocal regulation of their metabolism and signaling pathway. Plant Molecular Biology 71: 61-80.
- Choi H.I.**, H. J. Park, P. JiHye, S. Kim, M. Y. Im, H. H. Seo, Y. W. Kim, I. Hwang y K. Soo Young (2005) *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase AtCPK32 interacts with

- ABF4, a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, and modulates its activity. *Plant Physiology* 139: 1750-1761.
- Clark K. L.**, P. B. Larsen, X. Wang y C. Chang (1998) Association of the *Arabidopsis* CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS1 ethylene receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 5401-5406.
- Finkelstein R.**, S. S. L. Gampala, T. J. Lynch, T. L. Thomas y C. D. Rock (2005) Redundant and distinct functions of the ABA response loci ABA-INSENSITIVE(ABI)5 and ABRE-BINDING FACTOR (ABF)3. *Plant Molecular Biology* 59: 253-267.
- Gamble R. L.**, M. L. Coonfield y G. E. Schaller (1998) Histidine kinase activity of the ETR1 ethylene receptor from *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 7825-7829.
- Geiger D.**, S. Scherzer, P. Mumm, A. Stange, I. Marten, H. Bauer, P. Ache, S. Matschi, A. Liese, K. A. S. Al-Rasheid, T. Romeis, y R. Hedrich (2009) Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 21425-21430.
- Geiger D.**, S. Scherzer, P. Mumm, I. Marten, P. Ache, S. Matschi, A. Liese, C. Wellmann, K. A. S. Al-Rasheid, E. Grill, T. Romeis, y R. Hedrich (2010) Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 8023-8028.
- Ghassemian M.**, E. Nambara, S. Cutler, H. Kawaide, Y. Kamiya y P. McCourt (2000) Regulation of Abscisic Acid Signaling by the Ethylene Response Pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 12: 1117-1126.
- Guzmán P.** y J. R. Ecker (1990). Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *The Plant Cell* 2:513-523.
- Hansen H.** y K. Grossman (2000) Auxin-Induced Ethylene Triggers Abscisic Acid Biosynthesis and Growth Inhibition. *Plant Physiology* 124: 1437-1448.
- Hirayama T.** y K. Shinozaki (2007) Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends Plant Science* 12:343-351.
- Hrabak E.M.**, C. W. Chan, M. Gribskov, J. F. Harper, J. H. Choi, N. Halford, J. Kudla, S. Luan, H. G. Nimmo, M. R. Sussman, M. Thomas, K. Walker-Simmons, J-K. Zhu y A. C. Harmon (2003) The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiology* 132: 666-680.
- Ichimura K.**, T. Mizoguchi, R. Yoshida, T. Yuasa, y K. Shinozaki (2000). Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *The Plant Journal* 24: 655-665.
- Kieber J. J.**, M. Rothenberg, G. Roman, K. A. Feldman y J. R. Ecker (1993) *CTR1*, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell* 72: 427-441.

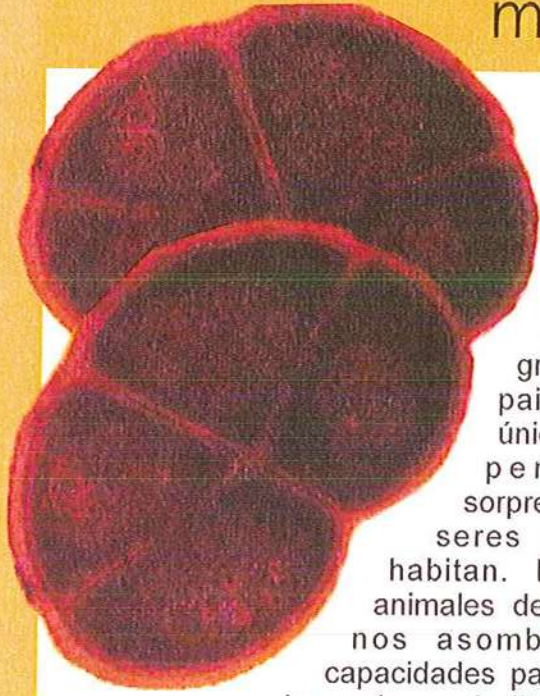
- Knight L. I.**, R. C. Rose y W. Crocker (1910) Effects of various gases and vapors upon etiolated seedlings of the sweet pea. *Science* 31: 635-636.
- Lee S.C.**, W. Lan, B. B. Buchanan y S. Luan (2009) A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 21419-21424.
- Leung J.**, M. Bouvier-Durand, P. C. Morris, D. Guerrier, F. Chefdor y J. Giraudat (1994) *Arabidopsis* ABA response gene ABI1: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* 264: 1448-1452.
- Leung J.**, S. Merlot y J. Giraudat (1997) The *Arabidopsis* ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (ABI2) and ABI1 genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *The Plant Cell* 9: 759-771.
- Ma Y.**, I. Szostkiewicz, A. Korte, D. Moes, Y. Yang, A. Christmann y E. Grill (2009) Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324: 1064-1068.
- Meyer K.**, M. P. Leube y E. Grill (1994) A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 264: 1452-1455.
- Miura K.**, J. Lee, J. B. Jin, C. Y. Yoo, T. Miura y P. M. Hasegawa (2009) Sumoylation of ABI5 by the *Arabidopsis* SUMO E3 ligase SIZ1 negatively regulates abscisic acid signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 5418-5423.
- Mustilli A. C.**, S. Merlot, A. Vavasseur, F. Fenzi y J. Giraudat (2002) *Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *The Plant Cell* 14: 3089-3099.
- Novikova G. V.**, I. E. Moshkov, A. R. Smith y M. A. Hall (2000) The effect of ethylene on MAP kinase-like activity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 474: 29-32.
- Ohme-Takag M.** y H. Shinshi (1995) Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *The Plant Cell* 7: 173-182.
- Ouaked F.**, W. Rozhon, D. Lecourieux y H. Hirt (2003) A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *The EMBO Journal* 22: 1282-1288.
- Pandey S.**, Nelson D. C., Assmann S. M. (2009) Two novel GPCR type G proteins are abscisic acid receptors in *Arabidopsis*. *Cell* 136: 136-148.
- Parkinson J. S.** (1993) Signal transduction schemes of bacteria. *Cell* 73: 857-871.
- Park S.**, P. Fung, N. Nishimura, D. R. Jensen, H. Fujii, Y. Zhao, S. Lumba, J. Santiago, A. Rodrigues, T. F. Chow, S. M. Alfred, D. Bonetta, R. Finkelstein, N. J. Provart, D. Desveaux, P. L. Rodriguez, P. McCourt, J. Zhu, J. I. Schroeder, B. F. Volkman y S. R. Cutler (2009) Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324: 1068-1071.
- Raghavendra A. S.**, V. K. Gonugunta, A. Christmann y E. Grill (2010) ABA perception and signaling. *Trends in Plant Science* 15: 395-401.

- Rodríguez P.L.**, G. Benning y E. Grill (1998) ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* 421: 185-190.
- Rodríguez F. I.**, J. J. Esch, A. E. Hall, B. M. Binder, G. E. Schaller y A. B. Bleeker (1999) A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Science* 283: 996-998.
- Saavedra X.**, A. Modrego, D. Rodríguez, M. P. González-García, L. Sáenz, G. Nicolás y O. Lorenzo (2010) The nuclear interactor PYL8/RCAR3 of *Fagus sylvatica* FsPP2C1 is a positive regulator of abscisic acid signaling in seeds and stress. *Plant Physiology* 152: 133-150.
- Santiago J.**, A. Rodrigues, A. Saez, S. Rubio, R. Antoni, F. Dupeux, S. Y. Park, J. A. Márquez, S. R. Cutler y P. L. Rodrigues (2009) Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. *The Plant Journal* 60: 575-578.
- Schaller G. E.**, A. N. Ladd, M. B. Lanahan, J. M. Spanbauer y A. B. Bleeker (1995) The ethylene response mediator ETR1 from *Arabidopsis* forms a disulfide-linked dimer. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 12526-12530.
- Schaller G. E.** y A. B. Bleeker (1995) Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the *Arabidopsis* ETR1 gene. *Science* 270: 1809-1811.
- Schaller G. E.** y J. J. Kieber (2002) Ethylene. *The Arabidopsis Book* 1: 1-18.
- Sharp R. E.**, M. E. LeNoble, M. A. Else, E. T. Thome y F. Gherardi (2000) Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: evidence for an interaction with ethylene. *Journal of Experimental Botany* 51: 1575-1584.
- Siegel R.S.**, S. Xue, Y. Murata, Y. Yang, N. Nishimura, A. Wang y J. I. Schroeder (2009) Calcium elevation-dependent and attenuated resting calcium-dependent abscisic acid induction of stomatal closure and abscisic acid-induced enhancement of calcium sensitivities of S type anion and inward-rectifying K channels in *Arabidopsis* guard cells. *The Plant Journal* 59: 207-220.
- Solano R.**, A. Stepanova, Q. Chao y J. R. Ecker (1998) Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE RESPONSE-FACTOR1. *Genes and Development* 12: 3703-3714.
- Subbiah V.** y K. J. Reddy (2010) Interactions between ethylene, abscisic acid and cytokinin during germination and seedling establishment in *Arabidopsis*. *Journal of Biosciences* 35: 451-458.
- Thomine S.**, R. Wang, J. M. Ward, N. M. Crawford y J. I. Schroeder (2000) Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 4991-6.

- Umezawa T.**, K. Nakashima, T. Miyakawa, T. Kuromori, M. Tonakura, K. Shinozaki y K. Yamaguchi-Shinozaki (2010) Molecular Basis of the Core Regulatory Network in ABA Responses: Sensing, Signaling and Transport. *Plant Cell Physiology* 51: 1821-1839.
- Umezawa T.**, N. Sugiyama, M. Mizoguchi, S. Hayashi, F. Myouga, K. Yamaguchi-Shinozaki, Y. Ishihama, T. Hirayama y K. Shinozaki (2009) Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 17588-17593.
- Vlad F.**, S. Rubio, A. Rodrigues, C. Sirichandra, C. Belin, N. Robert, J. Leung, P. L. Rodríguez, C. Laurière y S. Merlota (2009) Protein phosphatases 2C regulates the activation of the Snf1-related kinase OST1 by abscisic acid in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 21:3170-3184.
- Wang Y.**, C. Liu, K. Li, F. Sun, H. Hu, X. Li, Y. Zhao, C. Han, W. Zhang, Y. Duan, M. Liu y X. Li (2007) *Arabidopsis* EIN2 modulates stress response through abscisic acid response pathway. *Plant Molecular Biology* 64: 633-644.
- Yamaguchi-Shinozaki K.** y K. Shinozaki (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology* 57: 781-803.
- Yoshida R.**, T. Hobo, K. Ichimura, T. Mizoguchi, F. Takahashi, J. Aronso, J. R. Ecker y K. Shinozaki (2002) ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology* 43:1473-1483.
- Zhang M.**, B. Yuan y P. Leng (2009) The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. *Journal of Experimental Botany* 60: 1579-1588.
- Zhu S.Y.**, X. C. Yu, X. J. Wang, R. Zhao, Y. Li, R. C. Fan, Y. Shang, S. Y. Du, X. F. Wang, F. Q. Wu, Y. H. Xu, X. Y. Zhang y D. P. Zhang (2007) Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 19:3019-3036.

Extremófilos:

microorganismos viviendo al límite



La tierra es un planeta increíblemente hermoso. Su gran variedad de paisajes lo hace único en el universo, pero igual de sorprendente son los seres vivos que lo habitan. Las plantas y animales de "gran tamaño" nos asombran con sus capacidades para sobrevivir en los más recónditos lugares, por ejemplo ¿Quién no ha visto una hermosa postal de un oso polar confundido con la espesa nieve blanca?, ¿O una planta cactácea en un ambiente desértico? Ambos climas nos parecen extremos para sobrevivir, sin embargo en cada rincón del planeta, o al menos donde se ha buscado, se ha encontrado vida. Quizás no encontremos un pez viviendo en agua hirviendo a más de 100°C, tampoco un ser humano que viva sin oxígeno, pero sí hay microorganismos que pueden hacerlo y se les conoce como extremófilos.

Existen microorganismos como las bacterias que pueden sobrevivir en las más extremas condiciones de vida que puedas imaginar y habitar cada rincón del planeta, por muy lejano, frío, ácido o caliente que te parezca. Las bacterias son un tipo de microorganismos invisibles para el ojo humano y sólo con la ayuda de un microscopio se pueden observar. Pero hay una bacteria que es

tan grande que se puede ver a simple vista pues, ¡mide casi un centímetro! Su nombre

científico es *Thiomargarita namibiensis*, que significa Perla Sulfurosa de Namibia. Como su nombre lo indica, se encontró en las costas del país africano de Namibia y

La bacteria más resistente a la radiación: *Deinococcus radiodurans*.

Gustavo Santoyo Pizano

parece una perla blanca, de ahí su nombre. Pero también existe otro tipo de bacterias o células muy pequeñas, incluso, son millones de veces más pequeñas que *Thiomargarita namibiensis*. De hecho, no se sabe exactamente si son bacterias verdaderas o un tipo de célula mucho más antigua, conocida como "arquea", sólo se les conoce como células ARMAN (del inglés que significa Nanoorganismo Acidófilico ARqueal) y se encontraron en una mina en California, EU.

A los humanos nos gusta disfrutar de un baño con agua tibia, ¿Verdad? Pero, ¿Qué tal si te bañaras con agua hirviendo? Mejor ni imaginarlo. Pues hay microorganismos como la arquea de nombre *Pyrolobus fumarii* que le encanta el agua hirviendo, de hecho su temperatura óptima para crecer es 106°C. Aunque en su medio ambiente sobrevive a temperaturas que varían entre 90 y 113°C. Pero cuidado con que la temperatura baje menos de 90°C ¡Pues no crecerá! Su nombre *fumarii* proviene de la palabra latina *fumarii* que significa chimenea y realmente vive en chimeneas, pero chimeneas submarinas en el océano Atlántico. A los microorganismos como *Pyrolobus*, se les conoce como termófilos. En el otro extremo de las temperaturas viven organismos psicrófilos, es decir, que les gustan las temperaturas frías. Un ejemplo es la bacteria psicrófila *Psychromonas ingrahamii*, la cual crece a temperaturas de -12 o -20°C. Aunque es difícil de imaginar, esta bacteria disfruta vivir por debajo del punto de congelación del agua, ya que fue aislada de las aguas heladas del océano Ártico.

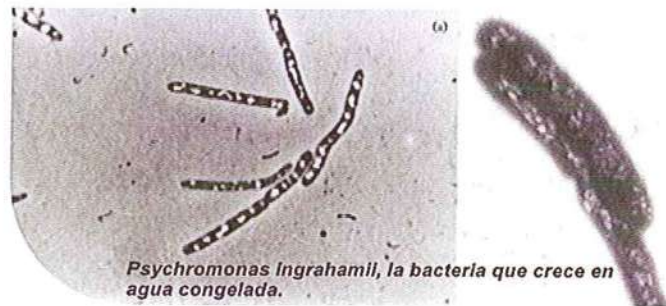


La bacteria más grande del mundo: *Thiomargarita namibiensis*, comparada con el tamaño de una abeja.

Las bacterias pueden vivir en condiciones extremas como las que mencionamos anteriormente, pero hay otros tipos de condiciones que no son nada fáciles de sobrevivir; tales como las altas concentraciones de sales, ya que pueden ser dañinas para muchos organismos. A las bacterias que les gusta la sal se les conoce como halófilos. Una bacteria halófila es *Salinibacter ruber*, que fue descubierta en España en un estanque empleado para la producción de sal, por lo que prácticamente *Salinibacter* puede vivir y alimentarse en granos de sal. No es de extrañarse que el hombre durante milenios haya desarrollado métodos de preservación de alimentos con sales, porque al no haber muchos microorganismos que toleren estas circunstancias, es una buena opción para almacenarlos y que se conserven por largos periodos de tiempo.

Otro tipo de microorganismos son los acidófilos, es decir, aquellos que viven en condiciones de acidez extrema. Lo ácido y lo alcalino se miden en pH (potencial de hidrógeno), en una escala que va del 1 al 14; siendo 1 lo más ácido y 14 lo más alcalino. Algunas arqueobacterias como *Picrophilus oshimae* y *Picrophilus torridus* pueden vivir a un pH menor a 1. Tan bajo como -0.06, incluso su pH óptimo para crecer es 0.7. El estómago de un ser humano es muy ácido, alrededor de 1, necesario para digerir los alimentos, pero si llegara a ser menor de 1, seguro necesitarías más que un sal de uvas.

Hasta el momento hemos visto que no hay otros organismos más extremos que los microorganismos, y aún hay más que parecen disfrutar de vivir al límite. Existen bacterias como *Deinococcus radiodurans*, que es el organismo que más radiación resiste, incluyendo los rayos ultravioleta o radiación gamma, que emite el sol. Las cantidades de radiación que resiste *Deinococcus*, fácilmente matarían a cualquier humano. Se dice que si hubiera una tercera guerra mundial donde se



Psychromonas Ingrahamii, la bacteria que crece en agua congelada.

usen bombas atómicas los únicos organismos sobrevivientes serían las cucarachas. Probablemente sea cierto que sobrevivan las cucarachas, pero seguramente también lo harían las bacterias como *Deinococcus*. Otro tipo de bacterias que son muy "fuertes", incluso más que cualquier elefante, son aquellas que se conocen como barófilas o hiperbarófilas, que resisten altas presiones. Algunas especies como *Shewanella* y *Moritella* se han encontrado a una profundidad de casi 11,000 metros bajo el nivel del mar, lo que significaría resistir el peso de millones de toneladas encima.

Los anteriores microorganismos son sólo algunos ejemplos que sorprenden por sus récords para poder vivir en ambientes tan extremos. Pero este artículo sería demasiado largo para describirlos todos, ya que hay otras bacterias que pueden o no vivir donde hay oxígeno, u otras que pueden únicamente respirar azufre o alimentarse de metales pesados, entre otros muchos. Además hay muchas otras que pueden ser muy amigables con el medio ambiente y limpiar o biorremediar lugares contaminados con petróleo, por ser su alimento favorito. Por lo tanto, cada vez que viajes a lugares desérticos, a los bosques o a la playa, siempre habrá microorganismos conviviendo contigo. También, si algún día viajas al espacio o algún otro planeta como Marte, que tampoco te sorprenda encontrarte con alguna bacteria en el camino. ¡Seguramente es un extremófila!

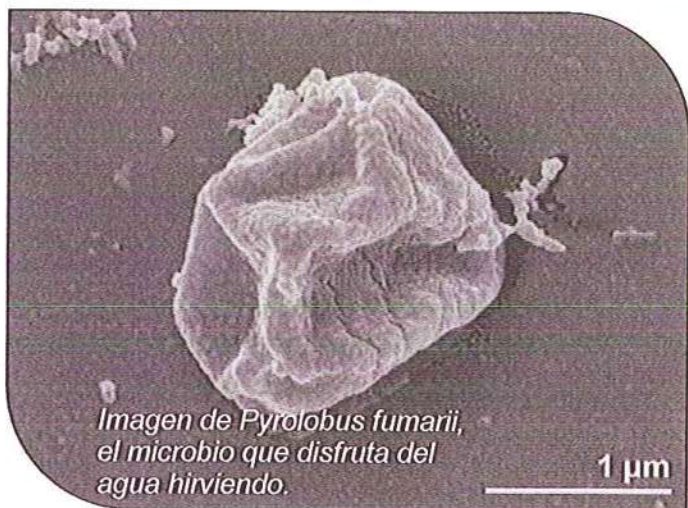


Imagen de *Pyrolobus fumarii*, el microbio que disfruta del agua hirviendo.

Gustavo Santoyo Pizano, Profesor de Microbiología, Maestría en Ciencias en Biología Experimental, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas-UMSNH.

Mario Abad, Salvador Barrera, Lorena Farías, Omar González, Edith Muñoz, Melina Olivo, Sandra Rodríguez, Ricardo Santillán y Marco Valle. Estudiantes de la Maestría en Ciencias en Biología Experimental, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas-UMSNH.