



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Instituto de Investigaciones Químico Biológicas

Maestría en Ciencias en Biología Experimental

TESIS

“Caracterización de los procesos moleculares y celulares inducidos por la N-vanillil-octanamida sobre el crecimiento y desarrollo del sistema radicular de *Arabidopsis thaliana*”

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Maestro en Ciencias en Biología Experimental

PRESENTA:

IBQ. SAÚL VÁZQUEZ FUENTES

ASESORES:

D.C. JESUS SALVADOR LOPEZ BUCIO
D.C. RAMON PELAGIO FLORES

Agradecimientos

A la Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo por la educación y ambiente de aprendizaje brindado a lo largo del posgrado.

Al Laboratorio de Biotecnología Molecular de Plantas del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo a cargo del Dr. Homero Reyes de la Cruz, y a todos sus integrantes por brindarme las facilidades para la realización de este proyecto y permitirme desempeñar en un ambiente de trabajo agradable y óptimo donde pude conocer buenas personas de las que pude aprender y crecer personalmente.

A mis asesores el DC. Jesús Salvador López Bucio y el DC. Ramón Pelagio Flores por sus enseñanzas, paciencia, confianza y apoyo, así como a la atención y empeño puesto en el asesoramiento del proyecto contribuyendo en mi formación como maestro en ciencias. También agradezco la amistad que me brindaron.

A los profesores del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas que fueron mis mentores a lo largo de esta etapa de mi vida donde bloque con bloque me formaron como profesionista con su saber, esfuerzo, paciencia y confianza.

A mis amigos con los que compartir alegrías, logros, problemas, tristezas, esfuerzo, felicidad y con los que avanzamos hasta culminar y terminar nuestra estancia en el laboratorio.

Al Concejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología, por el apoyo brindado para la realización de este proyecto el cual me permitió dedicar todos mis esfuerzos a la realización del presente proyecto.

DEDICATORIAS.

A mis padres y familia

Que, con amor y gracias a su apoyo, cuidado y cariño, me forjaron como persona y me ayudaron a crecer hasta convertirme en lo que soy. Que sin importar lo que suceda siempre los amare.

A mis amigos

Con los que aprendí incontables cosas, con los que viví un sinfín de experiencias, que me llenaron de momentos que recordar. Por qué los amigos son la familia que se elige.

A mis profesores y mentores

Cuyo conocimiento y sabiduría me fue brindado, que con su paciencia y forma de enseñar me hicieron crecer de forma mental y emocional, permitiéndome aprender no solo en el ámbito escolar y profesional sino a como ser una mejor persona.

A Andrea mi novia

Que durante 10 años a mi lado me ha visto crecer, aprender y mejorar, que gracias a su apoyo y motivación he podido avanzar y compartir esta etapa de mi vida, dándome su amor incondicional y que día a día me hace muy feliz por permitirme compartir cada momento a su lado.

A mi hermano

En especial quiero dedicar este trabajo a mi hermano, que incondicionalmente siempre ha estado allí, apoyándome, haciéndome feliz, permitiendo liberarme de todos los problemas, que ha sido mi motivación, mi ejemplo, y una de mis razones para vivir; que nunca me ha dejado solo y siempre se ha preocupado por mí. A mi hermano que sin importar lo que suceda siempre lo amaré. *Solo quiero decirte que en tanto estemos juntos todo va a salir muy bien al final y nada podrá hacernos daño.*

SIMBOLOS Y ACRONIMOS

| | |
|-------|--|
| NVO | N-vanillil-octanamida |
| ANOVA | Análisis de varianza |
| °C | Grados Celsius |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| NCBI | Centro Nacional para la Información Biotecnológica |
| TRPV1 | Receptor de potencial transitorio V1 en inglés |
| g | Gramos |
| mM | Milimolar |
| mg | Miligramos |
| μM | Micromolar |
| mm | Milímetros |
| cm | Centímetros |
| μg | Microgramos |
| μm | Micrómetros |
| μL | Microlitros |
| min | minutos |
| h | horas |
| s | segundos |
| IAA | Ácido indol-3-acético |
| NAA | Ácido naftalen acético |
| NPA | Ácido naftil ftalamico |
| Trp | Triptófano |
| RAM | Root apical meristem o meristemo apical de la raíz |
| QC | Quiescent center o centro quiescente |
| MS | Murashige-Skoog |

INDICE

| | |
|---|------|
| SIMBOLOS Y ACRONIMOS | I |
| RESUMEN | VII |
| ABSTRACT | VIII |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| MARCO TEÓRICO | 3 |
| 1. Las plantas | 3 |
| 1.1. El desarrollo vegetal | 3 |
| 1.1.1. El sistema radicular | 4 |
| 2. Los reguladores del desarrollo (fitohormonas)..... | 5 |
| 2.1. Vía de señalización auxínica..... | 6 |
| 2.1.1. Homeostasis de auxinas | 8 |
| 3. Factores que afectan el desarrollo de las plantas..... | 9 |
| 4. Metabolitos secundarios | 11 |
| 4.1. Capsaicinoides | 12 |
| ANTECEDENTES | 16 |
| JUSTIFICACIÓN | 21 |
| HIPÓTESIS | 21 |
| OBJETIVO GENERAL | 21 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 21 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 22 |
| N-vanillil-octanamida | 22 |
| Material vegetal y condiciones de crecimiento..... | 22 |
| Medición de la zona de crecimiento y proliferación celular..... | 24 |
| Análisis histoquímico e histológico | 24 |
| Análisis estadístico | 25 |
| ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 26 |
| La N-vanillil-octanamida inhibe el crecimiento de la raíz primaria e induce la formación de raíces laterales en <i>Arabidopsis thaliana</i> | 26 |
| La N-vanillil-octanamida inhibe la proliferación celular y la respuesta auxínica en el meristemo de la raíz primaria de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 32 |
| La N-vanillil-octanamida altera la homeostasis de auxinas en el nicho de células iniciales | 34 |

| | |
|--|----|
| Tratamientos con auxinas exógenas y precursores de su síntesis disminuyen los efectos de la N-vanillil-octanamida en la raíz primaria de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 41 |
| La N-vanillil-octanamida modifica la expresión del gen de biosíntesis de auxinas antranilato sintasa | 47 |
| La N-vanillil-octanamida produce un efecto sitio específico sobre el meristemo radicular de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 48 |
| CONCLUSIONES | 50 |
| PERSPECTIVAS | 52 |
| REFERENCIAS | 53 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estructura celular de la raíz primaria de <i>arabidopsis thaliana</i> | 5 |
| Figura 2. clasificación de las fitohormonas..... | 6 |
| Figura 3. elementos involucrados en la respuesta auxínica..... | 8 |
| Figura 4. transporte polarizado de auxinas..... | 9 |
| Figura 5. biosíntesis de capsaicinoides..... | 13 |
| Figura 6. estructuras de distintos capsaicinoides y variaciones en el grado de pungencia..... | 15 |
| Figura 7. imagen comparativa de la estructura química entre capsaicina y n-vanillil-octanamida..... | 16 |
| Figura 8. efecto de la capsaicina sobre el crecimiento de <i>arabidopsis thaliana</i> | 18 |
| figura 9. efecto de la n-vanillil-octanamida sobre el crecimiento de la raíz de <i>arabidopsis thaliana</i> | 19 |
| Figura 10. efecto de hormesis producido por n-vanillil-octanamida sobre el sistema radicular de <i>arabidopsis thaliana</i> | 28 |
| Figura 11. efecto de la n-vanillil-octanamida sobre el sistema radicular de plántulas de <i>arabidopsis thaliana</i> trasplantadas. | 29 |
| Figura 12. la n-vanillil-octanamida reduce la longitud de la zona meristemática y de elongación de la raíz primaria de <i>a. thaliana</i> | 31 |
| Figura 13. inhibición de la actividad mitótica y respuesta auxínica producida por la n-vanillil-octanamida..... | 33 |
| Figura 14. efecto de la n-vanillil-octanamida sobre el crecimiento de la raíz primaria sobre líneas mutantes y transgénicas en la señalización auxínica. | 35 |

| | |
|---|----|
| Figura 15. las líneas mutantes responsables del transporte auxínico basipetal responden diferencialmente a la n-vanillil-octanamida siendo pin3 (transporte eflujo) resistente y aux1-7 (transporte influjo) hipersensible. | 37 |
| Figura 16. la línea transgénica sobreproductora de auxinas 35s::yuc4 es resistente al efecto de n-vanillil-octanamida. | 39 |
| Figura 17. la n-vanillil-octanamida afecta la homeostasis de auxinas en el meristemo apical de la raíz. | 41 |
| Figura 18. las auxinas exógenas o bloquear el flujo auxínico amortigua el efecto producido por la n-vanillil-octanamida. | 43 |
| Figura 19. el precursor auxínico triptófano inhibe el efecto producido por la n-vanillil-octanamida. | 44 |
| Figura 20. el triptófano restablece la actividad mitótica y auxínica inhibida por la n-vanillil-octanamida | 46 |
| Figura 21. n-vanillil-octanamida estimula la expresión del gen de asa (proteína antranilato sintasa), y la expresión del gen pin4 (transportador de eflujo pin4) en los haces vasculares de la planta, pero lo reprime en la cofia de la raíz. | 47 |
| Figura 22. el mecanismo de acción de la n-vanillil-octanamida es sitio específico, actuando a nivel del meristemo de la raíz. | 49 |
| Figura 23. la n-vanillil-octanamida inhibe la biosíntesis de auxinas regulando negativamente la homeostasis auxínica en el nicho de células madre del meristemo apical de la raíz. | 51 |

RESUMEN

Las plantas por su naturaleza sésil, se encuentran expuestas a diferentes agobios ambientales a lo largo de su ciclo de vida, por lo que han desarrollado un conjunto de estrategias que les permiten adaptarse. Los capsaicinoides son compuestos de gran interés, responsables de la sensación de picor de los frutos del género *Capsicum* y cuya función biológica está asociada con la protección contra la herbívoría y el ataque de patógenos. Por esta razón, es necesario conocer los posibles efectos de estas sustancias sobre el desarrollo de las plantas con el fin de vislumbrar su potencial biotecnológico.

En el presente trabajo se caracterizaron los efectos del capsaicinoide sintético N-vanillil-octanamida en el desarrollo del sistema radicular y la señalización auxínica de *Arabidopsis thaliana*. Los resultados muestran una inducción en la formación de raíces laterales, así como efectos de hormesis sobre el crecimiento de la raíz primaria en donde las concentraciones bajas (7 a 14 μM) promueven su crecimiento, mientras que concentraciones altas (>21 μM) lo disminuyen. La inhibición del crecimiento de la raíz primaria resulta de la pérdida de la actividad proliferativa en el meristemo apical de la raíz y correlaciona con una disminución en la señalización auxínica. Al inducir la acumulación de auxinas en el nicho de células madre mediante el uso de líneas transgénicas y mutantes de *Arabidopsis* que sobreexpresan genes relacionados con la biosíntesis de estas hormonas y que carecen de genes de transportadores de auxinas respectivamente, así como por la aplicación de auxinas y sus precursores de manera exógena (IAA, NAA, NPA y Triptófano), se observó la reversión del efecto inhibitorio ocasionado por la N-vanillil-octanamida. Los resultados anteriores sugieren un antagonismo del capsaicinoide sobre la homeostasis de las auxinas en la raíz.

Palabras clave: Capsaicinoides, bioactividad, auxinas, meristemo, homeostasis celular.

ABSTRACT

Plants by their sessile nature, are exposed to different environmental stressors throughout their life cycle, so they have developed a set of strategies that allow them to adapt. Capsaicinoids are compounds of great interest, responsible for the pungent sensation of fruits of the genus *Capsicum* and whose biological function is associated with protection against herbivory and attack by pathogens. For this reason, it is necessary to know the possible effects of these substances on the development of plants in order to glimpse their biotechnological potential.

In the present work, the effects of the synthetic capsaicinoid N-vanillil-octanamide on the development of the root system and auxin signaling of *Arabidopsis thaliana* were characterized. The results show an induction in the formation of lateral roots, as well as hormesis effects on the growth of the primary root where low concentrations (7 to 14 μM) promote its growth, while high concentrations ($>21 \mu\text{M}$) decrease it. Inhibition of taproot growth results from loss of proliferative activity in the root apical meristem and correlates with disrupted auxin signaling.

By inducing the accumulation of auxins in the stem cell niche through the use of transgenic *Arabidopsis* lines that overexpress genes related to the biosynthesis of these hormones and mutants related to the auxins transport genes, as well as by the application of auxins and their precursors (IAA, NAA, NPA and Tryptophan) exogenously, the reversal of the inhibitory effect caused by N-vanillil-octanamide was observed. The above results suggest an antagonism of capsaicinoid on auxins homeostasis in the root.

Key words: Capsaicinoids, bioactivity, auxins, meristem, cell homeostasis.

INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos esenciales en los ecosistemas, ya que forman la base de las cadenas tróficas como productores primarios y, además, proporcionan oxígeno y una gran variedad de materias primas y recursos para el ser humano (Hui, 2012). Cumplen su ciclo de vida ancladas a un sustrato y su supervivencia depende en gran medida de su capacidad para responder adecuadamente y adaptarse a los diferentes estímulos de su entorno, los cuales pueden dividirse en bióticos o abióticos (Benkova *et al.*, 2016; Zadnikova *et al.*, 2015).

Los agobios (estímulos negativos) de tipo abiótico, son todos aquellos que no son ocasionados por organismos vivos, entre los que se incluyen factores como granizadas, sequía, salinidad, metales, pH extremo, escasez de nutrientes etc., mientras que los de tipo biótico incluyen el ataque de plagas, depredadores y patógenos (He *et al.*, 2018; Imran *et al.*, 2021; Iqbal *et al.*, 2021). Las adaptaciones de las plantas a factores bióticos incluyen la producción de metabolitos secundarios, sustancias producidas como parte del metabolismo regular de las células, que no son vitales para la supervivencia, pero que tienen funciones adaptativas importantes, como favorecer relaciones simbióticas, evitar la depredación, protección contra enfermedades, ventajas en la competencia contra otros organismos y resistencia ante factores físicos, químicos y biológicos. Estas moléculas pueden clasificarse en fenilpropanos, acetogeninas, terpenoides, alcaloides y esteroides (Pang *et al.*, 2021; Suryawanshi y Vidyasagar, 2016; Wahyuni *et al.*, 2013).

Los capsaicinoides son metabolitos secundarios de naturaleza alcaloide producidos por las plantas del género *Capsicum*, su potencial biotecnológico se asocia a la pungencia que presentan estos compuestos, con aplicaciones como antifúngicos, antimicrobianos, antitumorales, antiinflamatorios, antioxidantes, analgésicos, para la pérdida de peso y como aditivo alimenticio, siendo esta última la más popular (Arce-Rodríguez y Ochoa-Alejo, 2019; Costa *et al.*, 2022). Su producción y función en las plantas se ha demostrado como protección contra depredadores y patógenos, adicionalmente se ha sugerido como un mecanismo de alelopatía contra diferentes especies vegetales, sin embargo, este fenómeno

no se ha descrito de manera precisa. Estudios recientes muestran bioactividad en plantas, particularmente, en el desarrollo del sistema radicular y en la germinación de las semillas (Rezendes-Naves *et al.*, 2019). Sin embargo, los mecanismos que subyacen a su actividad biológica se conocen muy poco.

El sistema radicular es de vital importancia para la supervivencia, en diversas especies está conformado por una raíz primaria que es el eje principal de crecimiento, y de la cual se forman las raíces laterales y pelos radiculares para establecer un sistema de anclaje, exploración y absorción de agua y nutrientes; y su crecimiento y desarrollo está sostenido por procesos de división, elongación y diferenciación para dar lugar a los diferentes tejidos (Campbell y Reece, 2005; Ryan *et al.*, 2016).

Diferentes factores de estrés, particularmente los que se encuentran asociados al sustrato como la disponibilidad de nutrientes, de agua, la salinidad, la presencia de metales pesados, la acidez o alcalinidad, así como organismos patógenos en la rizosfera, impactan de manera negativa el desarrollo del sistema radicular afectando el crecimiento y su ramificación (Gull *et al.*, 2019). Los ajustes en la arquitectura de la raíz ocurren mediante mecanismos dependientes de las rutas de señalización de hormonas vegetales, siendo las auxinas una de las hormonas que influyen directamente sobre la proliferación, elongación y diferenciación celular (Motte *et al.*, 2019A; Pirelli *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2011).

La ruta de señalización de las auxinas ha sido ampliamente estudiada, en ella participa una gran cantidad de componentes incluyendo proteínas de síntesis, de transporte, de percepción, efectores, represores y blancos de regulación, que actúan de manera coordinada para conservar los niveles y la homeostasis de esta hormona; los diferentes cambios genéticos o ambientales que alteren dicha homeostasis resultan en respuestas pleiotrópicas frecuentemente negativas en el desarrollo no solo del sistema radicular sino de toda la planta (Albert, 2008; Lavenus *et al.*, 2013).

En el presente trabajo se caracterizaron los procesos celulares y moleculares inducidos por el capsaicinoide N-vanillil-octanamida que se llevan a cabo en el meristemo apical de la raíz y que resultan en su inhibición del crecimiento en *Arabidopsis thaliana*, dependientes

de cambios en la señalización auxínica. Los resultados que se discutirán revelan los niveles auxínicos necesarios para el mantenimiento de la actividad proliferativa de la raíz primaria y pueden ser tomados en cuenta para ser aplicados en la adaptación del desarrollo ante otros tipos de estrés.

MARCO TEÓRICO

1. Las plantas

Las plantas son esenciales para el desarrollo de la vida tal y como se conoce actualmente, siendo de vital importancia para la mayoría de los ecosistemas terrestres, además, cumplen un sinnúmero de propósitos en actividades cotidianas de la sociedad, ya que nos proveen alimentos, materia prima, combustibles, cosméticos, medicamentos, etc.

Son organismos multicelulares sésiles, es decir, viven anclados a un sustrato teniendo que adaptarse a las condiciones del entorno durante el ciclo vital (Zadnikova *et al.*, 2015). La aparente falta de desplazamiento se compensa mediante mecanismos altamente efectivos para acceder a fuentes nutrimentales, agua y luz, y realizar la fotosíntesis (Campbell y Reece, 2005); esta característica coloca a las plantas en la base de la mayoría de las cadenas tróficas al ser los productores primarios y uno de los principales productores de oxígeno (Taiz y Zeiger 2006; Hopkins y Huner, 2008; Hui, 2012).

1.1. El desarrollo vegetal

El desarrollo de las angiospermas comienza con la formación de la semilla, una estructura que permite resguardar y mantener la integridad del embrión (Han y Yang, 2015); durante la embriogénesis, el cigoto, que ha proliferado rápidamente hasta adquirir una estructura polarizada, genera la raíz y los brotes del follaje (Wang *et al.*, 2021; Goldberg *et al.*, 1994). Este conjunto de células polarizadas comienza a diferenciarse para establecer los distintos tipos de células que conformarán a la planta, pudiendo distinguirse futuras células epidérmicas en el exterior, tejido fundamental de soporte y tejido vascular (Hardtke y Berleth, 1998). Posteriormente, el extremo del brote dará lugar a los cotiledones (Armenta-Medina *et al.*, 2021), después de este proceso el desarrollo del embrión se detiene, y la

semilla entra en latencia hasta que existan las condiciones propicias para que germine y comience a desarrollar un nuevo organismo (Han y Yang, 2015; Miransari y Smith, 2014). Durante la germinación, el embrión emerge de la semilla, esto provocado por la hidrólisis de ácido abscísico (ABA), la hidratación de las células y la ruptura de la testa, permitiendo la emergencia de la raíz, posteriormente la activación de la mitosis en el brote dará lugar a los tallos y hojas (Alberts *et al.*, 2002; Weitbrecht *et al.*, 2011; Vu y De Smet, 2016). Mientras la raíz se abre paso a través del sustrato, el brote influenciado por señales ambientales abre los cotiledones, el meristemo se activa por la presencia de la luz, se forman las primeras hojas y comienza el proceso de fotosíntesis (Alberts *et al.*, 2002; Kramer, 2015; Réthore *et al.*, 2019). Cuando la planta es fotosintéticamente activa, genera biomasa y almacena los carbohidratos necesarios antes de iniciar el proceso reproductivo una vez se alcance la fase adulta.

1.1.1. El sistema radicular

El sistema radicular da sostén a los tejidos fotosintéticos, permite el anclaje, absorbe y almacena nutrientes minerales y agua, lo que lo convierte en un órgano fundamental para el desarrollo de las plantas (Cambell y Reece, 2005). El crecimiento del sistema radicular comienza con la formación de la raíz, eje central de crecimiento que será la base para la formación del resto del sistema, y que incluye diferentes regiones: Meristemo, zona de elongación, zona de maduración y zona de diferenciación (**Figura 1**; Bargmann *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2012). Las células del meristemo pueden completar varios ciclos de división hasta entrar en un proceso de transición, para posteriormente inducirse la elongación celular y diferenciarse completamente (van den Berg *et al.*, 1997; Motte *et al.*, 2019A).

La ramificación del sistema radicular está dada por el establecimiento de raíces laterales que se forman a partir de la raíz primaria o de ejes de crecimiento preexistentes cuyo inicio se induce en las células del periciclo (Motte *et al.*, 2019B; Hetherington y Dolan, 2018). Estas ramificaciones permiten la exploración del sustrato, por lo tanto, amplían la zona de captación de nutrientes y agua al cubrir una mayor área. Finalmente, los pelos radiculares

son estructuras celulares que se forman por procesos de diferenciación de las células epidérmicas denominadas tricoblastos que físicamente están en contacto con dos células corticales (Vissenberg *et al.*, 2020). Su función principal es aumentar el área superficial de la raíz y en consecuencia el área de contacto que tiene la planta con el sustrato.

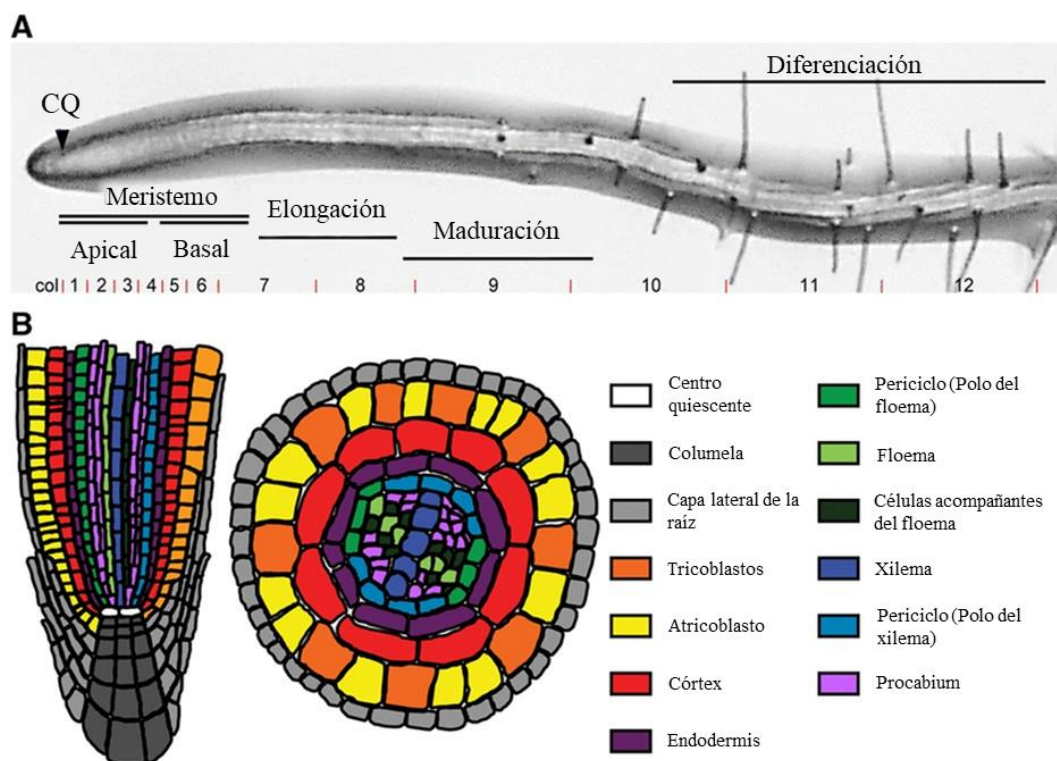


Figura 1. Estructura celular de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*. A) Zonas de crecimiento y desarrollo. B) Líneas celulares que conforman la raíz primaria, del lado izquierdo se muestra una representación de un corte lateral de la raíz y del lado derecho un corte transversal (Bargmann *et al.*, 2013).

2. Reguladores del desarrollo (fitohormonas)

Las fitohormonas regulan diferentes procesos de desarrollo. Estas incluyen a las auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno, brasinoesteroides, salicilatos, jasmonatos y estrigolactonas (**Figura 2**). En conjunto, estos compuestos potencian los procesos que conducen al crecimiento vegetativo, la reproducción, la senescencia, y respuestas ante el estrés (Yamaguchi *et al.*, 2010; Mukherjee *et al.*, 2022).

El desarrollo del sistema radicular depende de la función de las auxinas y las citocininas. Las auxinas inducen procesos proliferativos y la expansión celular, mientras que las citocininas inducen procesos de diferenciación relacionados a la respuesta ante el estrés (Lee *et al.*, 2012). Otras fitohormonas, pueden influir sobre la homeostasis y señalización causando cambios en los programas de desarrollo (Albert, 2008; Lavenus *et al.*, 2013).

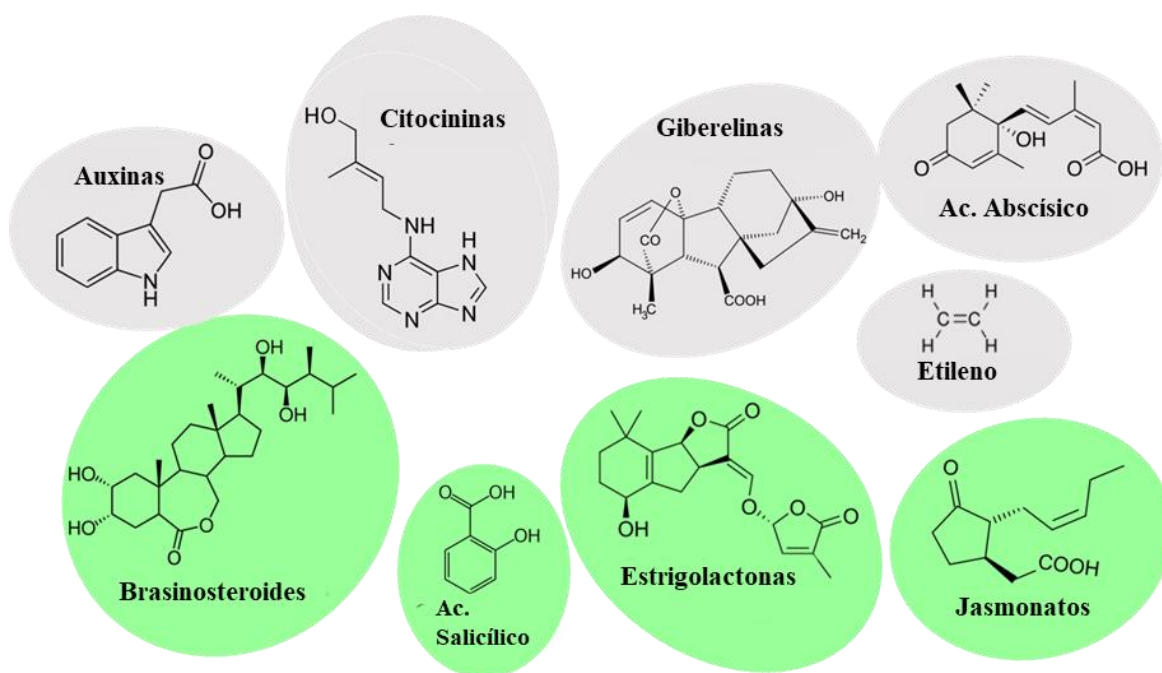


Figura 2. Principales reguladores del crecimiento vegetal. Se muestran las estructuras químicas de los diferentes compuestos.

2.1. Vía de señalización auxínica

El ácido indol-3-acético (AIA) es la principal auxina sintetizada por las plantas. Esta hormona se sintetiza a partir de diferentes vías, siendo las principales dependientes del aminoácido triptófano. Sus efectos más notorios incluyen la estimulación de la formación de raíces laterales y pelos radiculares y un acortamiento de la raíz primaria (Fukui y Hayashi, 2018).

La biosíntesis, degradación, transporte y señalización son componentes importantes en la homeostasis de auxinas, la alteración de alguno de estos procesos conduce a una

desregulación de los procesos mediados por esta fitohormona, por ejemplo, deficiencias en el crecimiento y ramificación de la raíz se han observado en plantas mutantes que tienen una delección o alteración en algún gen importante relacionado con estos procesos (Zhang *et al.*, 2022; Brumos *et al.*, 2018).

Aunque existen diferentes vías y elementos involucrados en la síntesis de auxinas, una de las principales vías dependientes de triptófano involucra a las proteínas de biosíntesis TAA1 (Brumos *et al.*, 2018) y proteínas YUCCA (Cao *et al.*, 2019), ya que se ha observado que al inhibir de forma particular esta vía, se tienen efectos severos sobre el desarrollo de las plantas (Mashiguchi *et al.*, 2011; Brumos *et al.*, 2018). Una vez sintetizado el ácido indol acético, este cumple su función dentro de la misma célula o es exportado a otros tejidos por medio de proteínas de transporte, como canales de eflujo (proteínas PIN y ABCB) y canales de influjo (proteínas AUX/LUX) (Zazimalova *et al.*, 2010). La unión de las auxinas a sus receptores (TIR1 principalmente) inicia el proceso de señalización, formando el complejo de ubiquitinación SCF AFB/TIR1, que marca a los represores transcripcionales AUX/IAA para ser degradados por medio del proteasoma, liberando a los factores transcripcionales de respuesta auxínica ARF que regulan la expresión de genes de respuesta a auxinas involucrados en los diferentes procesos regulados por esta hormona (Lavenus *et al.*, 2013). Finalmente una vez que las auxinas cumplieron su función es necesario inactivarlas para que no generen una respuesta exacerbada, que llevaría a la intoxicación de la planta como se ha observado en los mecanismos de acción de algunos herbicidas como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético, el cual no puede ser metabolizado e inducen una sobre activación de la vía auxínica, para esta inactivación es necesaria la presencia de proteínas como GH3 (Fukui *et al.*, 2022) y DAO1 (Hayashi *et al.*, 2021) las cuales impiden que el ácido indol acético se una al receptor TIR1, impidiendo que se desencadene la vía de señalización (**Figura 3**; Fukui y Hayashi, 2018; Zhang *et al.*, 2022).

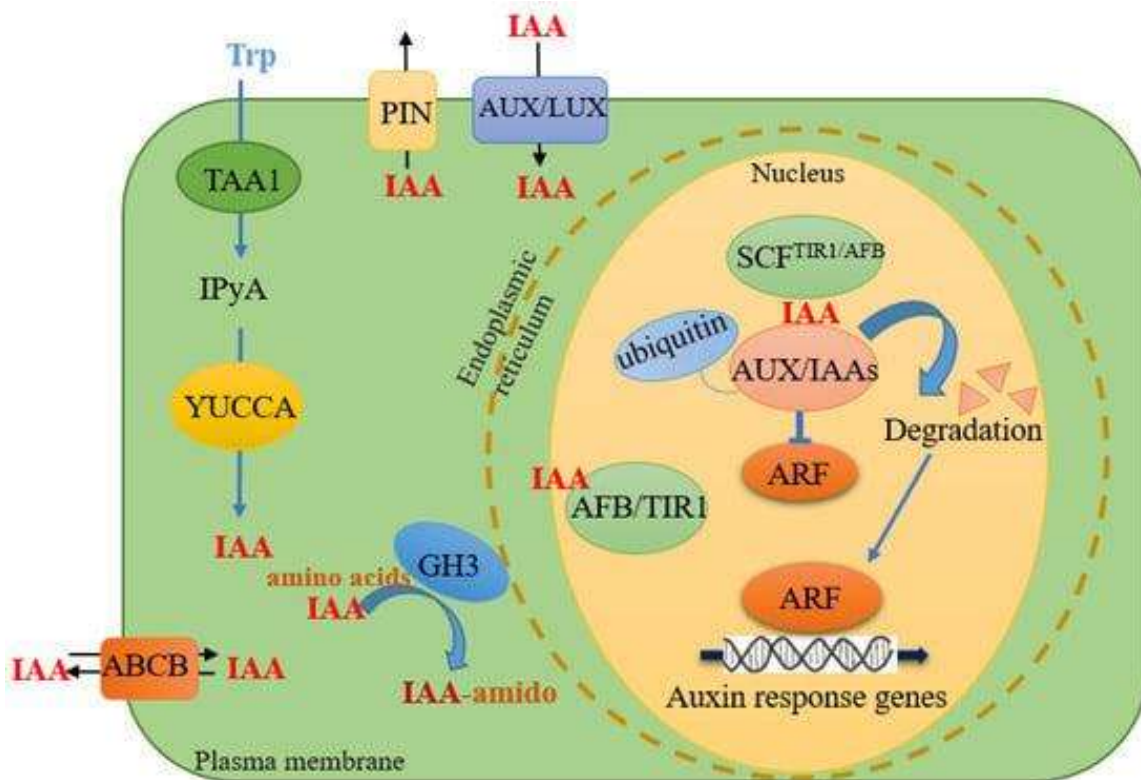


Figura 3. Elementos involucrados en la respuesta auxínica. Se muestran elementos de biosíntesis, inactivación, transporte y señalización auxínica y la zona de la célula donde estos cumplen su función (Zhang *et al.*, 2022).

2.1.1. Homeostasis de auxinas

La homeostasis consiste en el balance entre biosíntesis y degradación. La biosíntesis de auxinas se lleva a cabo en el citosol de las células de los meristemos para después ser transportadas para su distribución en la planta. Anteriormente, se pensaba que la biosíntesis de las auxinas ocurría exclusivamente en los brotes y desde allí se distribuían al resto de tejidos, sin embargo, en la actualidad se sabe que la síntesis en los brotes tiene poca influencia en las raíces y que es crucial que se sinteticen en estas últimas para que se lleve el correcto desarrollo del sistema radicular (Brumos *et al.*, 2018). En la raíz primaria y en las raíces laterales, las células que se encuentran alrededor del centro quiescente sintetizan auxinas, y su distribución a los diferentes tejidos ocurre por medio de los canales de eflujo

(PIN) e influjo (AUX/LAX) que se localizan en las membranas, desde el nicho de células madre hacia la columela para posteriormente ascender a través de la cofia, la capa lateral y la epidermis hasta la zona de transición del meristemo basal muy cerca de la zona de elongación donde hay un reflujo de auxinas hacia la punta de la raíz a través de los haces vasculares (**Figura 4**) (Leyser, 2005; van Berkel *et al.*, 2013). Es importante mencionar que donde ocurre el reflujo se forma otro máximo de auxinas, lo que permite inducir procesos como el “waving” o el “priming” para la formación de raíces laterales. Si esta homeostasis no ocurre de forma ordenada y coordinada, los procesos de formación de la raíz primaria no se llevan a cabo de manera adecuada, produciendo fenotipos aberrantes que impiden el desarrollo de las plantas (Rosquete *et al.*, 2012).

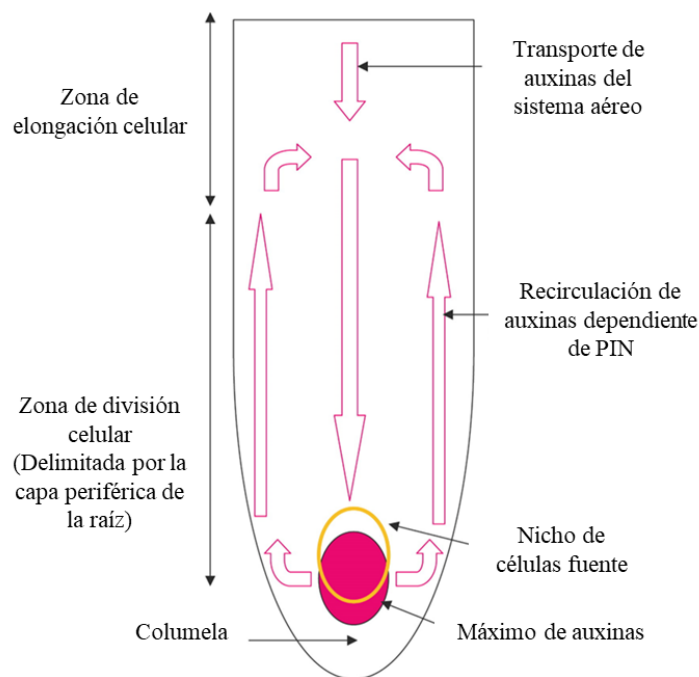


Figura 4. Transporte polarizado de auxinas. Se muestran el sitio de biosíntesis de las auxinas el cual se encuentra alrededor del QC en las células iniciales de los diferentes tejidos para posteriormente ser transportadas hacia la columela y ascender en forma de cascada invertida hacia la zona de transición. Finalmente existe un reflujo de auxinas hacia el centro quiescente (Leyser, 2005).

3. Factores que afectan el desarrollo de las plantas

Existen diferentes factores ambientales que impactan de manera positiva o negativa en el desarrollo vegetal. Aquellos que afectan el desarrollo de las plantas también conocidos

como factores de estrés, pueden generar una condición de crecimiento adversa, por lo tanto el esfuerzo de la planta aumenta para desencadenar un conjunto de respuestas adaptativas que le permitirán ser resiliente a dicho estímulo o bien producir efectos como un déficit de crecimiento, reproducción y producción de cultivos, daño permanente o incluso la muerte de la planta si el agobio supera el límite de tolerancia o capacidad adaptativa del organismo (Verma *et al.*, 2016).

Estos factores pueden clasificarse, dependiendo de su origen, en factores bióticos y abióticos (Mosa *et al.*, 2017). El estrés abiótico es producido por aquellos factores ambientales comúnmente relacionados con condiciones climáticas o nutrimentales, aunque en estos también se engloban a los producidos por la acción humana (Kranter *et al.*, 2010). Un desequilibrio en la temperatura, niveles de agua o humedad, radiación, viento, tropismos, distribución de nutrientes, salinidad y pH o la presencia de obstáculos y contaminantes son considerados agobios abióticos (He *et al.*, 2018; Imran *et al.*, 2021).

Si bien las plantas no pueden escapar ante estos estímulos poseen una serie de respuestas que les permiten tolerarlos (Mosa *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2020). Gran parte de las respuestas de las plantas a las situaciones de estrés están mediadas de manera fina por rutas de señalización hormonal. Por ejemplo, se ha observado una acumulación de ácido abscísico para tolerar condiciones de sequía, en conjunto con otras hormonas como el etileno, las citocininas y las auxinas (Rowe *et al.*, 2016); condiciones de estrés osmótico y salino disminuyen los niveles de auxinas y giberelinas (Valenzuela *et al.*, 2016; Shani *et al.*, 2017); el estrés oxidativo altera la distribución de los transportadores de auxinas (Su *et al.*, 2016), mientras que tratamientos con brasinoesteroides o ácido abscísico incrementan los niveles de peróxido de hidrógeno mientras que disminuyen los niveles de anión superóxido. Por otro lado, tratamientos con el precursor de etileno ACC incrementan el estrés oxidativo por el anión superóxido (Lv *et al.*, 2018; He *et al.*, 2012); hormonas como las auxinas, el etileno, el ácido salicílico, las citocininas, el ácido jasmónico y abscísico participan en la regulación de procesos de tolerancia al estrés por metales pesados.

Con la participación de las vías hormonales, se ha reportado la producción de metabolitos secundarios como respuesta a estrés, muchos de ellos inducen adaptación del desarrollo de

la planta ante la deficiencia de nutrientes, a toxicidad por metales, así como en la defensa contra pestes.

4. Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son un grupo de sustancias producidas por los organismos a partir de productos de vías metabólicas primarias y suelen ser exclusivos de cada organismo o familia de organismos, por lo que les brinda una forma diferente de adaptarse respecto a otros. Son comúnmente moléculas pequeñas de diferente naturaleza química clasificándose en fenilpropanos, acetogeninas, terpenoides, alcaloides y esteroides (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003; Facchini *et al.*, 2001). A pesar de no tener una función vital, desempeñan funciones que confieren adaptabilidad, por lo que se ha encontrado que su síntesis se induce ante los diversos tipos de estrés (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003; Sierra-Sarmiento *et al.*, 2018). Entre las funciones que pueden tener los metabolitos secundarios se encuentran:

- Favorecer relaciones simbióticas.
- Evitar la depredación.
- Protección contra enfermedades.
- Ofrecer ventajas en la competencia con otros organismos similares por la obtención de recursos.
- Resistencia ante factores físicos, químicos y biológicos.

Las plantas producen una serie de metabolitos secundarios que proporcionan resistencia contra las plagas y los depredadores (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003). Estas sustancias, muchas veces son secretadas en una mezcla compleja, como los aceites esenciales y son transportadas hacia el sitio donde se infecta la planta; muchos otros son producidos en órganos clave impidiendo que el patógeno llegue a esa zona, permitiendo salvaguardar su integridad y así poder continuar su desarrollo y/o reproducción (Sierra-Sarmiento *et al.*, 2018).

Por mucho tiempo se desconoció la importancia de estas sustancias, ya que se consideraba que eran solo productos de desecho del metabolismo primario, pero debido a la infinidad de funciones y ventajas que ofrecen, se ha generado un gran interés para emplearlos como medicamentos, antibióticos, insecticidas, herbicidas, etc.

4.1. Capsaicinoides

Los capsaicinoides son metabolitos secundarios de naturaleza alcaloide (Compuestos nitrogenados derivados de los aminoácidos) que se encuentran en los frutos de las plantas del género *Capsicum* y que son responsables del sabor picante del chile (**Figura 5**; Cedrón, 2013). Los principales capsaicinoides producidos naturalmente son la capsaicina y la dihidrocapsaicina, que ocupan el 90% de la producción de capsaicinoides en el chile, pero se conocen más de 20 compuestos cuya estructura varía principalmente en el número de carbonos de la cadena hidrofóbica y sus insaturaciones, aunque también pueden existir variaciones en el tipo de ramificaciones que posee la vanillilamina (parte aromática unida mediante un enlace amida a la cadena hidrofóbica), lo que le da a cada capsaicinoide variaciones en sus características, como la pungencia, que es la capacidad que tienen estas sustancias para causar la sensación de picor y ardor característica al consumir chile (Reyes-Escogido *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2019; Rezende-Naves *et al.*, 2019). Todos los capsaicinoides son amidas sintetizadas a partir de la condensación enzimática de vanillilamina y ácidos grasos de diferentes longitudes, lo que da como resultado una molécula compuesta por un grupo aromático que está unido por un enlace amida a una cadena hidrofóbica (**Figura 6**) (Vázquez-Flota *et al.*, 2007). Aunque se han encontrado capsaicinoides en diferentes partes de la planta, como las hojas y el tallo, estos se producen en la placenta del fruto, principalmente (Estrada *et al.*, 2002).

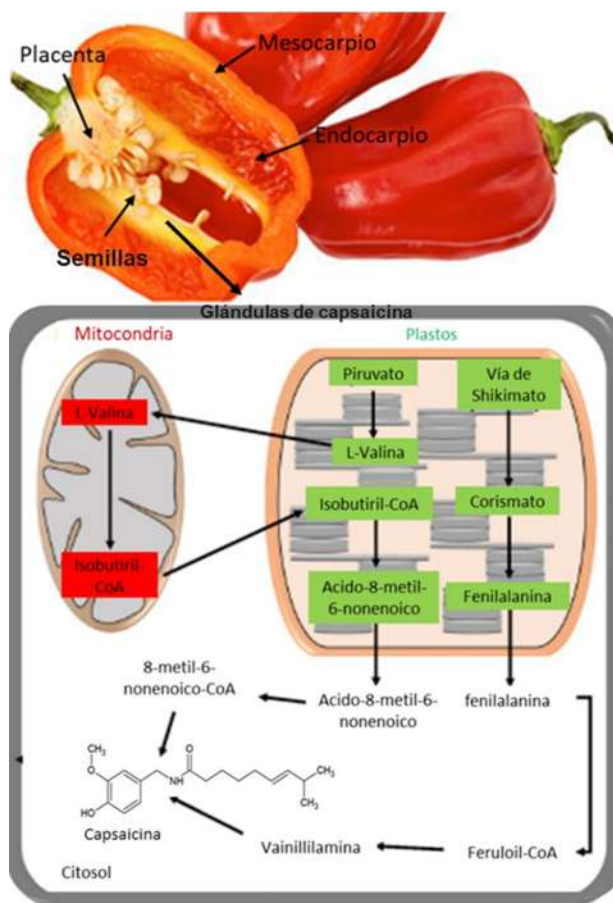


Figura 5. Biosíntesis de capsaicinoides. Los capsaicinoides se sintetizan en las glándulas cerca de la placenta a partir de dos vías, la vía fenilpropanoide que inicia en los plastos y termina en el citosol, resultando en la formación de vainillilamina; por otro lado, la vía de ácidos grasos de cadena ramificada que se lleva a cabo entre los plastos, mitocondria y citosol y resultando en la formación de 8-metil-6-nonenoil-CoA. Finalmente, los compuestos resultantes se condensan en el citosol mediante la acción de la enzima capsaicinoide sintasa formando los capsaicinoides, los cuales varían principalmente en su estructura por la longitud del ácido graso del que están formados (Rezende-Naves *et al.*, 2019).

4.1.1. Función biológica de los capsaicinoides

La pungencia es una sensación de ardor o quemadura al consumir capsaicinoides, por lo cual se ha sugerido que sus funciones en el entorno natural son de repeler a depredadores y plagas (Caterina *et al.*, 1997; Xing *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2013; Clark *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2018; Arce-Rodríguez y Ochoa-Alejo, 2019; Rezende-Naves *et al.*, 2019). La pungencia de un chile dependerá de los tipos de capsaicinoides que se producen por la

influencia de varios factores, tales como: la especie del chile, la cantidad de humedad ambiental y la temperatura, sin embargo, la capsaicina y dihidrocapsaicina son los compuestos que tienen más picor y los mayormente producidos (Haak *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2019). Las variaciones en las estructuras de los capsaicinoides producen cambios en la pungencia, siendo los capsaicinoides con longitudes de la cadena alifática más cercanas a la capsaicina y más cortos los que poseen los valores más altos de pungencia, conforme la longitud de esta cadena se aleja de la longitud de la capsaicina la pungencia disminuye (**Figura 6**; Chen *et al.*, 2019). En diferentes industrias se han llevado a cabo varios estudios para encontrar aplicaciones para estos compuestos. Se ha observado que los capsaicinoides tienen varias propiedades antiinflamatorias (Spiller *et al.*, 2010), antitumorales (Chapa-Oliver y Mejía-Teniente, 2016), antioxidantes y analgésicas (Antonious, 2018) y propiedades que ayudan a la pérdida de peso (Varghese *et al.*, 2016), lo que las convierte en moléculas de gran interés farmacológico, además de ser muy utilizadas como aditivo alimentario debido a su característico sabor (Lu y Cui, 2019).

De forma natural se ha observado que los capsaicinoides protegen a las plantas contra las infecciones fúngicas, disminuyendo el grado de la infección o impidiendo la colonización de la planta por el patógeno (Costa *et al.*, 2022; Tewksbury *et al.*, 2008; Vázquez-Fuentes *et al.*, 2021). Se sabe que las plantas del género *Capsicum* manifiestan un efecto alelopático sobre otras plantas impidiendo que se desarrollen de una forma adecuada alrededor de estas, sin embargo, este efecto no se ha atribuido a los capsaicinoides. Adicionalmente, se ha intentado averiguar qué tipo de efecto pueden inducir los capsaicinoides al ser aplicadas de forma exógenas sobre diferentes cultivos de interés, encontrando que pueden tener efectos sobre algunas etapas de desarrollo como la geminación de las semillas, sin embargo, el mayor efecto observado recae sobre el desarrollo del sistema radicular, donde los capsaicinoides inducen un efecto de hormesis en donde a concentraciones bajas promueven un mejor desarrollo y en concentraciones altas lo inhiben, esto abre la puerta a pensar que estas sustancias actúan regulando de manera muy fina diferentes aspectos del desarrollo en el sistema radicular que hasta el momento no han sido explorados (Barchenger y Bosland, 2016; Arin y Arabaci, 2019; Wang *et al.*, 2020).

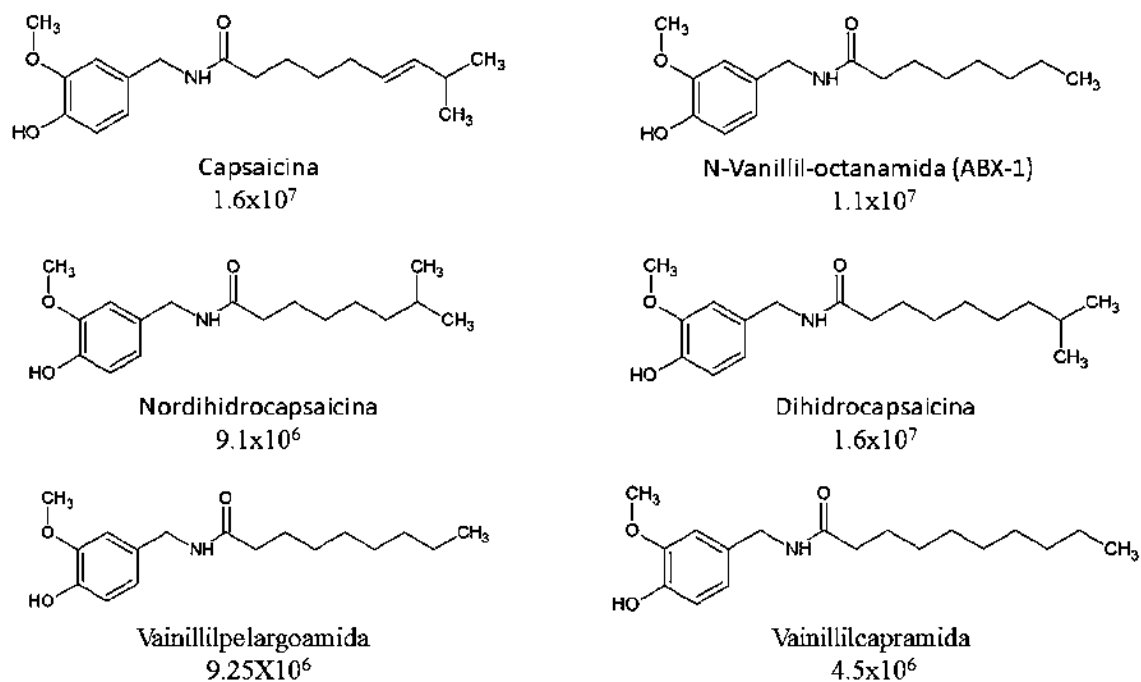


Figura 6. Estructuras de distintos capsaicinoides y variaciones en el grado de pungencia. El grado de pungencia se mide en unidades Escobille (Chen *et al.*, 2019).

ANTECEDENTES

Recientemente, con la finalidad de conocer el efecto antifúngico de un capsaicinoide sintético (N-vanillil-octanamida) y compararlo con la capsaicina (**Figura 7**), se evaluó su capacidad para inhibir el desarrollo de hongos fitopatógenos, así como su capacidad de proteger a las plantas y frutos de jitomate y aguacate contra la infección producida por *B. cinerea* y *C. gloeosporioides*, respectivamente (Vázquez *et al.*, 2021). Estos resultados muestran el potencial de N-vanillil-octanamida para coadyuvar en la confrontación de infecciones fúngicas. Sin embargo, el posible efecto causado por el compuesto sobre el desarrollo vegetal aún se desconocía.

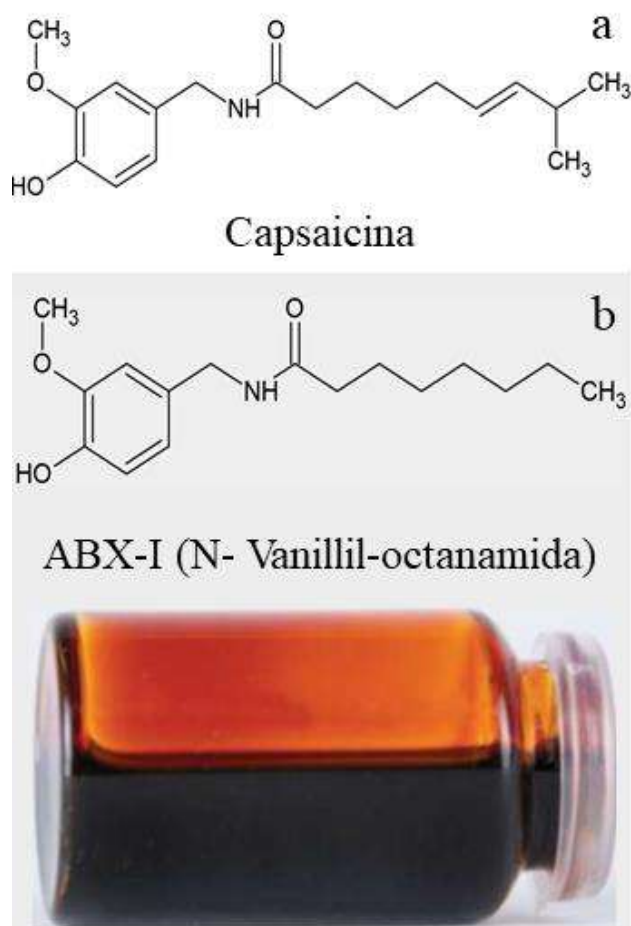


Figura 7. Imagen comparativa de la estructura química entre capsaicina y N-vanillil-octanamida. a) Estructura química de la capsaicina. b) Estructura química y presentación del capsaicinoide N-vanillil-octanamida. La N-vanillil-octanamida posee una cadena alifática más corta, no posee el radical metilo ni el enlace doble.

A este respecto, estudios incipientes muestran que los capsaicinoides pueden alterar el crecimiento y desarrollo de las plantas. Uno de estos estudios muestra que al aplicar de forma exógena concentraciones altas de capsaicina en chiles no picantes se observaba un retraso o impedimento en la germinación de las semillas (Barchenger y Bosland, 2016), lo que se confirmó en lechuga, berro, alfalfa, hierba de cangrejo, timoteo y raigrás, en las cuales, adicionalmente se observó la inhibición del crecimiento del hipocótilo y del sistema radicular (Kato y Tanaka, 2003; Wang *et al.*, 2018). Por otro lado, otros estudios concluyen que el efecto producido por los capsaicinoides en las plantas no es siempre inhibitorio, sino que tienen un efecto hormético en el que a concentraciones bajas tienen el potencial de inducir el desarrollo de plantas de chile, observándose una mejor vitalidad y mejorando el rendimiento de los frutos (Arin y Arabaci, 2019).

En estudios de nuestro grupo se compararon los efectos de la capsaicina y de la N-vanillil-octanamida sobre el desarrollo de *Arabidopsis thaliana* y se encontró que ambos compuestos tienen efectos sobre el desarrollo, principalmente en el sistema radicular y dependiendo de la concentración utilizada. Los tratamientos con concentraciones bajas (<40 μM) de capsaicina inducen el crecimiento de la raíz primaria mientras que dosis altas (>80 μM) tiene un efecto inhibitorio del crecimiento de la raíz primaria, sin embargo, todas las concentraciones utilizadas muestran una inducción de la formación de raíces laterales (**Figura 8**).

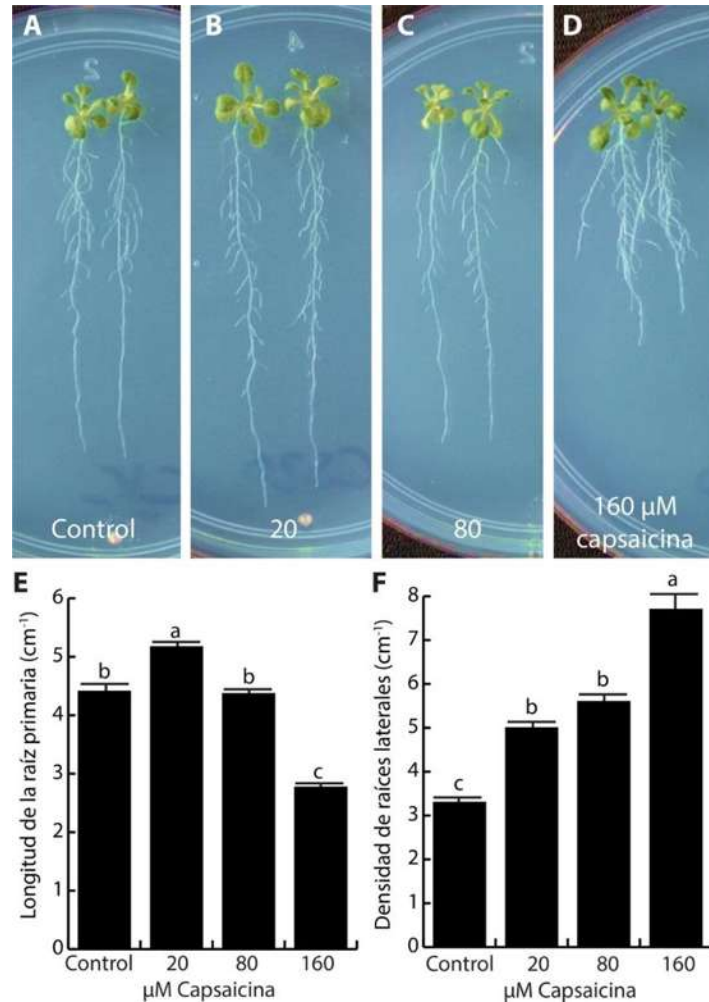


Figura 8. Efecto de la capsaicina sobre el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*. Inducción del crecimiento de la raíz primaria respecto al control con una concentración de capsaicina de 20 μM (Panel A, B), no se tienen efectos a 80 μM (Panel C) y se observa la represión de crecimiento a una concentración de 160 μM (Panel D) con diferencias significativas a partir de una ANOVA de una vía y valor $P=0.001$ (Panel E). Por otro lado, promueve la formación de raíces laterales de forma dosis dependiente (A-D) con diferencias significativas a partir de una ANOVA de una vía y valor $P=0.001$ (Panel F).

Por su parte, los efectos de la N-vanillil-octanamida son comparables a los de la capsaicina, pero en dosis menores, siendo inductoras e inhibitorias del crecimiento de la raíz primaria en concentraciones inferiores y superiores a 10 μM, respectivamente. Por su parte, el efecto inductor de la ramificación del sistema radicular se observa en todas las concentraciones utilizadas (**Figura 9**). Este fenotipo se asemeja al inducido por tratamientos de auxinas

exógenas donde se acorta la raíz primaria y se induce la producción de raíces laterales y pelos radiculares.

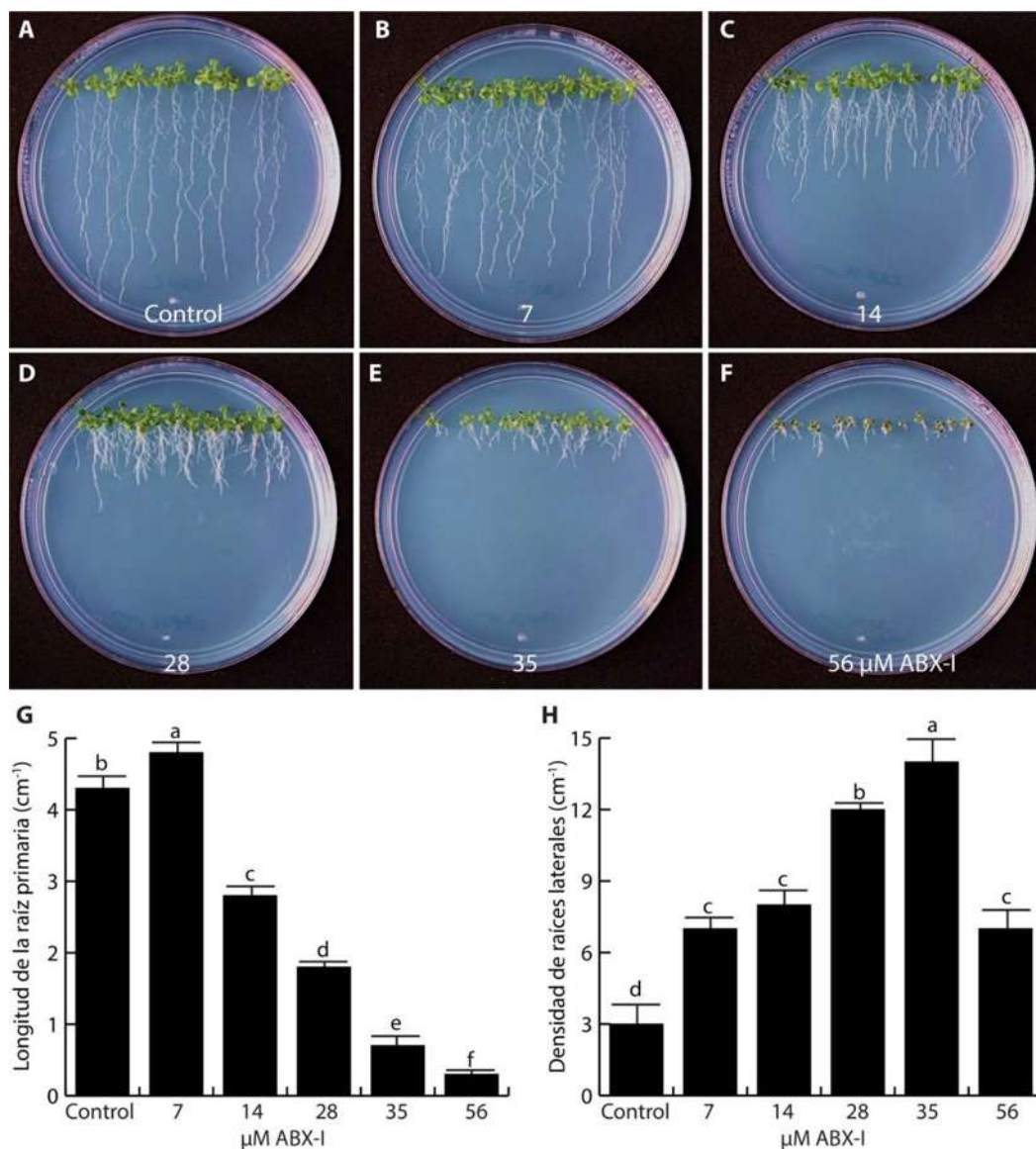


Figura 9. Efecto de la N-vanillil-octanamida sobre el crecimiento de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Se observa un efecto comparable producido por la capsaicina (Fig. 1), a menor concentración, mostrando inducción en el crecimiento de la raíz primaria en la concentración de 7 μM (Panel A) y disminución del crecimiento a partir de la concentración de 14 μM (Panel B-F). Por otro lado, la formación de raíces laterales aumenta al incrementar la dosis de N-vanillil-octanamida (Panel H).

Los resultados anteriores muestran que los capsaicinoides modulan el desarrollo del sistema radicular de manera dosis dependiente, sin embargo, se desconocen los procesos celulares inducidos, los mecanismos de señalización involucrados, así como los blancos de regulación molecular que resultan en la modificación fenotípica de la raíz de *Arabidopsis thaliana* y de otras plantas de importancia económica.

Este trabajo de tesis se enfocó en caracterizar el efecto que subyace en la inhibición del crecimiento de la raíz primaria de plantas de *Arabidopsis thaliana* bajo tratamientos de N-vanillil-octanamida.

JUSTIFICACIÓN

Los capsaicinoides son moléculas que tienen la capacidad de alterar procesos del crecimiento y desarrollo del sistema radicular en las plantas. Sin embargo, el conocimiento que tenemos respecto a su actividad en estos procesos y, por tanto, sobre los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la raíz son limitados. De tal manera que la caracterización detallada del efecto de los capsaicinoides, particularmente la N-vanillil-octanamida, sobre el crecimiento y desarrollo del sistema radicular y los mecanismos de acción involucrados en mediar dichas respuestas contribuirá de manera importante al conocimiento y aprovechamiento de este tipo de moléculas para su aplicación en el mejoramiento de las características de las plantas.

HIPÓTESIS

La N-vanillil-octanamida modula los cambios en la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana* regulando la señalización hormonal auxínica.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los elementos de la vía auxínica mediante los cuales el capsaicinoide N-vanillil-octanamida regula el desarrollo de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar los procesos celulares meristemáticos regulados por la N-vanillil-octanamida.
2. Evaluar los efectos de N-vanillil-octanamida sobre la regulación de la vía de señalización auxínica en el meristemo de la raíz primaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

N-vanillil-octanamida

La N-vanillil-octanamida (N-(4-hidroxi-3-metoxibencil) octanamida; ABX-I), fue donada por Applied Biotec S.A. de C.V., México. ABX-1 es un producto registrado y patentado (WO-2016/171538-A1). A partir del proceso de síntesis bioquímica descrito en la patente, el capsaicinoide N-vanillil-octanamida se obtiene con un alto rendimiento y pureza (>95%), confirmado por HPLC y RMN como se describe en Castillo *et al.*, 2007.

Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se usaron plantas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia 0 (Col-0); las mutantes *pin3*, *aux1-7*, *axr1-3*, *axr4-1*, *tir1*, *lbd16/18*, *arf7/19*, *slr1-1*, *eir1-1*; las líneas sobreexpresoras *35s pin1*, *35S::YUC4*; y las líneas transgénicas *CycB1::uidA DR5:uidA* y *pASA:GUS* como se indica a continuación.

Las semillas fueron desinfectadas con etanol al 70% durante 5 min e hipoclorito de sodio a 20% durante 7 min, finalizando con 5 lavados con agua destilada estéril. Posteriormente, las semillas fueron sometidas a un proceso de vernalización a 4 °C durante dos días para finalmente ser utilizadas en los diferentes experimentos. Las plantas fueron sometidas al tratamiento en diferentes etapas de desarrollo: desde la germinación y posterior a la germinación (Trasplantes).

Las plantas tratadas desde la germinación se hicieron crecer en medio Murashige-Skoog 0.2x (Murashige-Skoog basal salts mixture, M524; Phytotechnology) esterilizado, solidificado con fitoagar (Micropropagation Grade-Gracilaria; Phytotechnology) y suplementado con diferentes concentraciones de N-vanillil-octanamida 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 µM. Las semillas fueron sembradas alineadas en la parte superior de la caja de Petri y fueron colocadas a 65° respecto de un plano horizontal para favorecer el crecimiento de la raíz a favor del vector de gravedad. Las plantas fueron incubadas en una cámara de crecimiento Lumistell ICP-55 a 22 °C con un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad y 105 µmol/m² de intensidad luminosa. Después de 12 días de incubación se realizó la medición de parámetros de crecimiento (Longitud de raíz primaria y número de raíces laterales) y un

análisis histoquímico e histológico. Se usaron todas las concentraciones mencionadas para la línea silvestre ecotipo Col-0 y las líneas transgénicas *CycB1::uidA* y *DR5::uidA*. Para el resto de líneas mutantes y transgénicas se eligió la concentración de 35 μM ya que fue donde se observó el efecto más representativo. Se incluyó como control medio Murashige-Skoog suplementado con DMSO en un volumen similar a la concentración más alta del capsaicinoide.

Las plantas tratadas posterior a la germinación, primeramente, fueron germinadas en medio Murashige-Skoog 0.2x (Murashige-Skoog basal salts mixture, M524; Phytotechnology) estéril solidificado con fitoagar (Micropropagation Grade-Gracilaria; Phytotechnology) y se hicieron crecer a las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Después de 5 días de crecimiento fueron transferidas al mismo medio, pero en este caso suplementado con el capsaicinoide a 35 μM y en combinación con las auxinas ácido indol-acético (IAA a 0.01 y 0.02 μM), ácido naftalen-acético (NAA a 0.1 y 0.05 μM), el bloqueador del transporte de eflujo auxínico ácido naftilftalámico (NPA a 1 y 2 μM) y el precursor auxínico triptófano (TRP a 100 μM). A los 7 días en el tratamiento y 5 para la combinación con triptófano se realizó la medición de los parámetros de crecimiento y el análisis histoquímico. Este proceso se realizó sobre la línea silvestre ecotipo Col-0, las líneas transgénicas *CycB1::uidA*, *DR5::uidA* y las mutantes *pin3* y *aux1-7* en el caso del triptófano. Se incluyeron como controles IAA, NAA, NPA, TRP y DMSO.

Se realizó un segundo ensayo con plántulas trasplantadas sometidas a tratamientos parciales con el capsaicinoide en donde se colocaron secciones de medio MS 0.2x con el capsaicinoide a 35 μM y control con DMSO combinadas, estas secciones fueron cortadas de placas completas de medio con el tratamiento y la condición control, utilizando un bisturí y se manipularon en condiciones estériles con ayuda de una espátula y unas pinzas planas, las secciones se cortaron a una distancia de 2.5 cm desde el borde de la caja Petri y se mezclaron entre sí, para los controles positivo (capsaicinoide 35 μM) y negativo (DMSO) únicamente se realizó el corte sin hacer la combinación. Una vez que se realizaron las mezclas de los tratamientos se colocaron las plántulas de forma tal que la punta de la raíz quedara sobre aproximadamente 0.5 mm sobre la sección de mayor tamaño mientras el

resto de la planta se colocaba sobre la sección menor. Posteriormente, se hicieron crecer en las mismas condiciones anteriormente mencionadas.

Medición de la zona de crecimiento y proliferación celular

Para la medición de la zona de crecimiento y proliferación celular se fotografió la raíz primaria por medio de estereoscopia (Leica MZ6) y microscopia de Nomarski (Microscopio Leica DM500B). Posteriormente, se cuantificó la longitud de ambas zonas por medio del programa ImageJ. La zona de crecimiento fue cuantificada desde la punta de la raíz hasta la zona de maduración donde se podía apreciar la formación del primer pelo radicular. La zona de proliferación fue cuantificada desde la punta de la raíz hasta la zona de transición donde las células de la epidermis comienzan a tener el doble de longitud que las células iniciales.

Análisis histoquímico e histológico

Para el análisis histoquímico se empleó la tinción histoquímica de la beta-glucuronidasa (tinción GUS) y para el análisis histológico se utilizó la tinción con yodo.

Para la tinción GUS se utilizaron las líneas transgénicas *CycB1::uidA*, *DR5::uidA* y *pASA::GUS* las cuales una vez pasado el tiempo en los distintos tratamientos fueron teñidas e incubadas a 37 °C en oscuridad durante toda la noche en interacción con el reactivo X-Gluc (0.5 mg/mL 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D-glucuronido en buffer 100 mM de fosfato de sodio, pH 7). Una vez transcurrido el tiempo de tinción se realizó un proceso de clareo incubando las plantas teñidas a 62 °C en una solución de HCl 0.24 N en metanol al 20% (v/v) durante 30 min. Posteriormente la solución fue reemplazada por una solución de NaOH al 7% (m/v) en etanol al 60% (v/v) durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, las plantas fueron rehidratadas utilizando etanol al 40, 20 y 10% (v/v) y almacenadas utilizando glicerol 50% (v/v) (Malamy & Benfey, 1997). Para la realización del análisis histoquímico se realizó el montaje de las plantas sobre un portaobjetos con ayuda de agua destilada. Se realizó el análisis microscópico de 12 plantas transgénicas por

tratamiento utilizando microscopia Nomarski por medio de un microscopio Leica DM500B.

Para las tinciones con yodo se utilizó la línea silvestre Col-0 y aquellas mutantes y sobreexpresoras que presentaron un efecto diferencial al compuesto respecto a la planta silvestre, las cuales una vez pasado el tiempo en los distintos tratamientos se sometieron al proceso de clareo y almacenado en glicerol 50% anteriormente mencionado. Antes de realizarse los montajes para su análisis en el microscopio, fueron teñidas mediante una solución de yodo comercial (Tintura de yodo (2% I₂ y KI); Laboratorios Jaloma) durante 15 s y se eliminó el exceso de la tintura utilizando agua destilada. Finalmente, se realizó el mismo montaje y fueron analizadas por medio de microscopia Nomarski y óptica.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de todos los experimentos se realizó utilizando el software Graphpad Prism 5 y se corroboró utilizando el programa STATISTICA. Todos los experimentos fueron hechos por triplicado. Los datos obtenidos fueron analizados por medio de una ANOVA de una vía seguido una prueba post hoc de Tukey o una prueba t Student con una significancia de $p < 0.01$. Todas las gráficas muestran el promedio \pm el error estándar, mientras que las letras representan las diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La N-vanillil-octanamida inhibe el crecimiento de la raíz primaria e induce la formación de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*.

Para determinar el efecto del capsaicinoide en la germinación y desarrollo temprano se sembraron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 sobre medio de cultivo de Murashige-Skoog 0.2x suplementado con N-vanillil-octanamida en diferentes concentraciones y DMSO como control y se observaron los posibles efectos en la germinación de las semillas, sin embargo no se encontraron cambios significativos en ninguna de las concentraciones utilizadas (7, 14 21, 28 y 35 μM), esta observación contradice lo reportado en otros trabajos en donde la capsaicina disminuye la tasa de germinación de semillas de pimiento y chile a concentraciones de 100 o 500 ppm (Barchenger y Bosland, 2016; Arin y Arabaci, 2019); así como en semillas de la hierba de cangrejo, raigrás y zacate thimoty a concentraciones de 4.8, 11 y 22 mM respectivamente (Kato-Noguchi y Tanaka, 2003). Esta diferencia en el efecto en la geminación puede deberse a la variedad de los capsaicinoides, o la variabilidad genética u hormonal de las plantas analizadas, no obstante, no se descarta que pueda existir una alteración en la tasa de germinación de *Arabidopsis thaliana* al tratar las semillas con concentraciones superiores.

Con respecto al efecto en el desarrollo de las plántulas tratadas con las concentraciones mencionadas, nuestros resultados muestran un efecto similar al descrito en otros ensayos en los cuales la capsaicina, dihidrocapsaicina o extractos de plantas del género *Capsicum* sobre plantas de interés agronómico, donde se inhibe el desarrollo global del sistema radicular (Kato-Noguchi y Tanaka, 2003; Barchenger y Bosland, 2016; Arin y Arabaci, 2019). Encontramos que la N-vanillil-octanamida produce un efecto de hormesis, principalmente sobre el sistema radicular de *A. thaliana* observándose que a concentraciones bajas de 7 a 14 μM se induce el crecimiento de la raíz primaria; a concentraciones mayores a 21 μM se inhibe el crecimiento de la raíz primaria llegando a ser del 39.3% en la concentración de 28 μM (**Figura 10**), adicionalmente se observó que la formación de raíces laterales se incrementa de manera significativa lo cual se refleja en un incremento en la densidad de raíces laterales (**Figura 10**). Finalmente, la concentración de 35 μM causa un cese en el crecimiento de la raíz primaria con porcentaje de inhibición

relativo a las plántulas en condiciones control del 67.3% (**Figura 10 a y b**), por su parte, la formación de raíces laterales se induce, así como su crecimiento superando incluso la longitud de la raíz primaria. Si bien los estudios sobre el mecanismo mediante el cual los capsaicinoides reducen el crecimiento y desarrollo radicular de distintas plantas son escasos, este efecto de hormesis sobre la raíz ha sido reportado en múltiples plantas, por lo que es de suponer que existe un mecanismo de respuesta común para que se lleve a cabo.

Con respecto al efecto inhibitorio del crecimiento de la raíz primaria puede depender de una alteración de la proliferación celular en el meristemo radicular mientras que la estimulación de la formación de raíces laterales puede ser un producto de la pérdida de dominancia apical en la raíz primaria resultando en la activación de la formación de raíces laterales para compensar el estrés y mantener la capacidad de absorción de nutrientes del sustrato (Kebrom, 2017; Manson *et al.*, 2014).

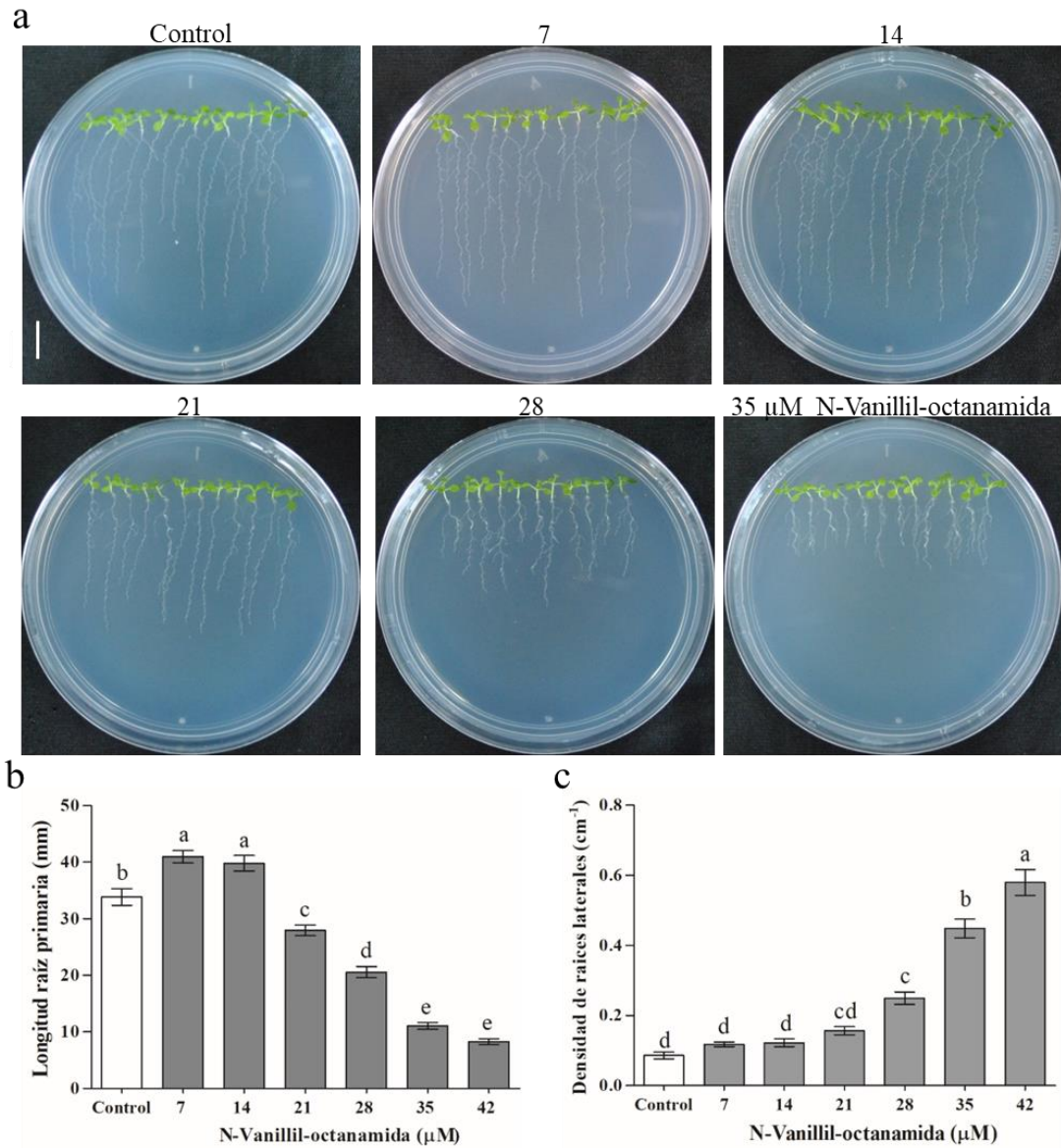


Figura 10. Efecto de hormesis producido por la N-vanillil-octanamida sobre el sistema radicular de *Arabidopsis thaliana*. a) Crecimiento de plantas de *A. thaliana* ecotipo Col-0 sobre medio MS suplementado con DMSO como control durante 12 días; la barra blanca representa la escala equivalente a 1 cm. b) Longitud de la raíz primaria en los distintos tratamientos con N-vanillil-octanamida comparados con el crecimiento en condiciones control. c) Densidad de raíces laterales producida por la N-vanillil-octanamida en distintas concentraciones comparadas con la densidad de raíces laterales en la condición control. b) y c) Las barras representan el promedio \pm error estándar de 33 plantas, las letras indican las diferencias estadísticas determinadas a través de ANOVA y un análisis post-hoc de Tukey ($P < 0.01$).

De manera complementaria se realizó una modificación en el tiempo de exposición a la N-vanillil-octanamida con la diferencia al experimento anterior que primero se germinaron las semillas y se dejaron crecer las plántulas durante 5 días en medio MS 0.2x, posteriormente se trasplantaron a cajas con medio MS 0.2x suplementadas con DMSO como control o con 7, 14, 21, 28 y 35 μM de N-vanillil-octanamida, los resultados obtenidos muestran efectos semejantes en la inhibición del crecimiento de la raíz primaria y la inducción en la formación de raíces laterales de manera dosis dependiente (**Figura 11 a, b y c**). De manera diferencial el crecimiento a concentraciones de 7 y 14 μM no se induce mientras que a 35 μM la raíz primaria crece únicamente unos milímetros (**Figura 11 a, b y c**).

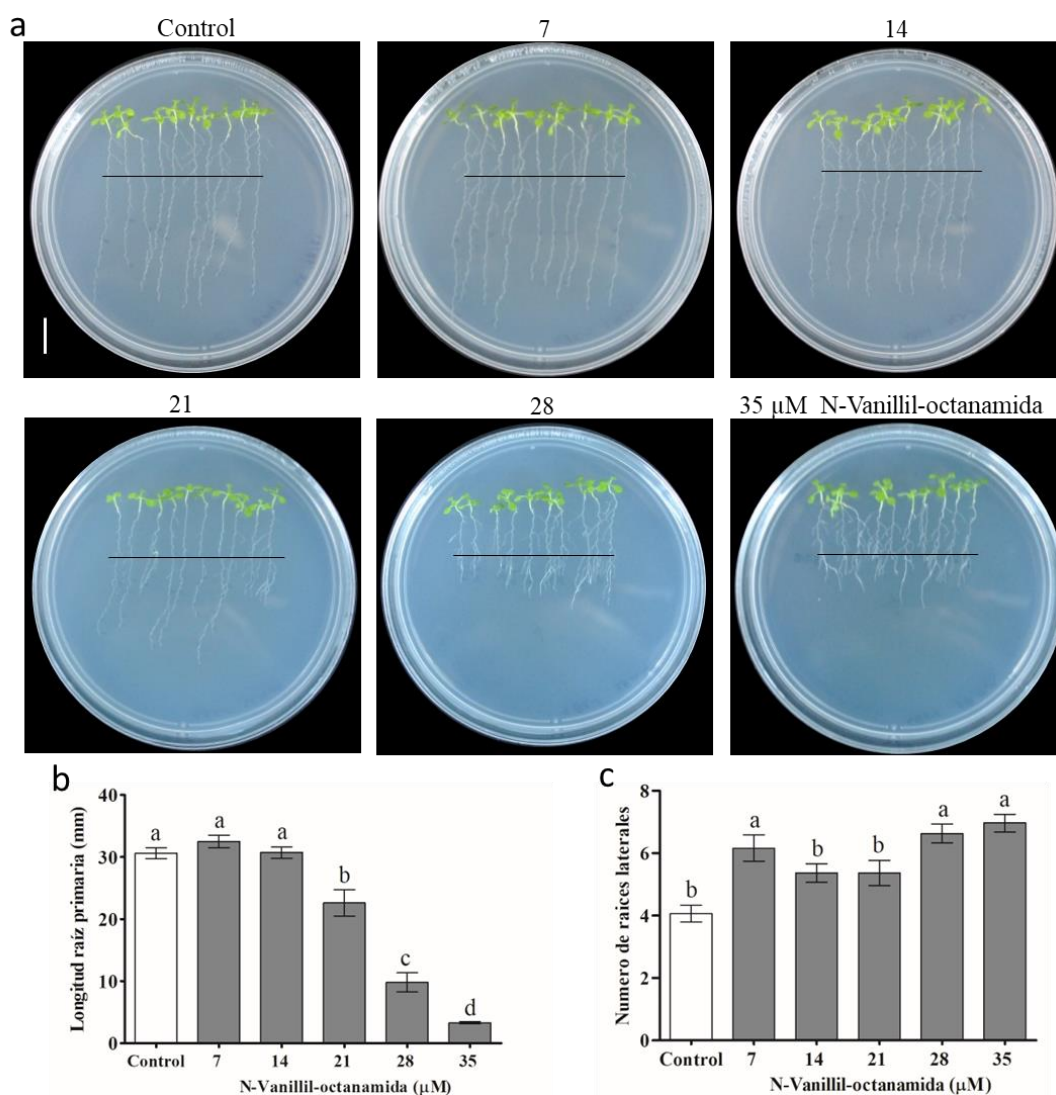


Figura 11. Efecto de la N-vanillil-octanamida sobre el sistema radicular de plántulas de *Arabidopsis thaliana* trasplantadas. a) Fotos representativas de plántulas de *A.*

thaliana ecotipo Col-0 7 días posterior al trasplante sobre medio MS suplementado con DMSO como control, así como a las concentraciones indicadas de N-vanillil-octanamida; la barra blanca representa la escala equivalente a 1 cm. La línea negra horizontal indica el día 0 post trasplante. b) Longitud de la raíz primaria en los distintos tratamientos con N-vanillil-octanamida comparados con el crecimiento en condiciones control. c) Número de raíces laterales producida por la N-vanillil-octanamida en distintas concentraciones comparadas con el número de raíces laterales en la condición control. b) y c) Las barras representan el promedio \pm error estándar de 33 plantas, las letras indican las diferencias estadísticas determinadas a través de ANOVA y un análisis post-hoc de Tukey ($P < 0.01$).

Adicionalmente, se puede observar la disminución del crecimiento del follaje de las plántulas, sin embargo, esto se puede deber al efecto sobre el sistema radicular afectando el correcto crecimiento y desarrollo del follaje, esto concuerda con algunos de los estudios realizados en trabajos previos por nuestro grupo, donde al aplicar el capsaicinoide por medio de aspersión sobre las hojas de tomate estas no presentaban una disminución en su tamaño o señales de daño ocasionadas por el compuesto (Vázquez *et al.*, 2021), sin embargo, este mecanismo localizado en el sistema radicular se explorará con más detalle posteriormente. Tomando como referencia que el mayor efecto observable se encuentra dirigido hacia el sistema radicular, este trabajo se centró en caracterizar los efectos producidos en este sistema.

Mediante un análisis magnificando la raíz primaria en un microscopio estereoscópico se observó que la zona de crecimiento de la raíz (zona de proliferación, zona de transición, zona de elongación) generalmente contenida entre la región apical de la raíz y el primer abultamiento que evidencia de la formación de los pelos radiculares en la zona de diferenciación, se observó que la zona de crecimiento disminuye de manera dosis dependiente por la N-vanillil-octanamida donde en condiciones control tiene una longitud promedio de los $837.5 \pm 105.8 \mu\text{m}$ mientras que a $35 \mu\text{M}$ esta zona alcanza unos $506.17 \pm 140.1 \mu\text{m}$ (**Figura 12 a y b**). La formación de pelos radiculares hacia el ápice de la raíz sugiere el desplazamiento de la zona de diferenciación por la posible disminución de la proliferación en el meristemo de la raíz lo que resultaría en el cese del crecimiento de la raíz primaria por agotamiento meristemático.

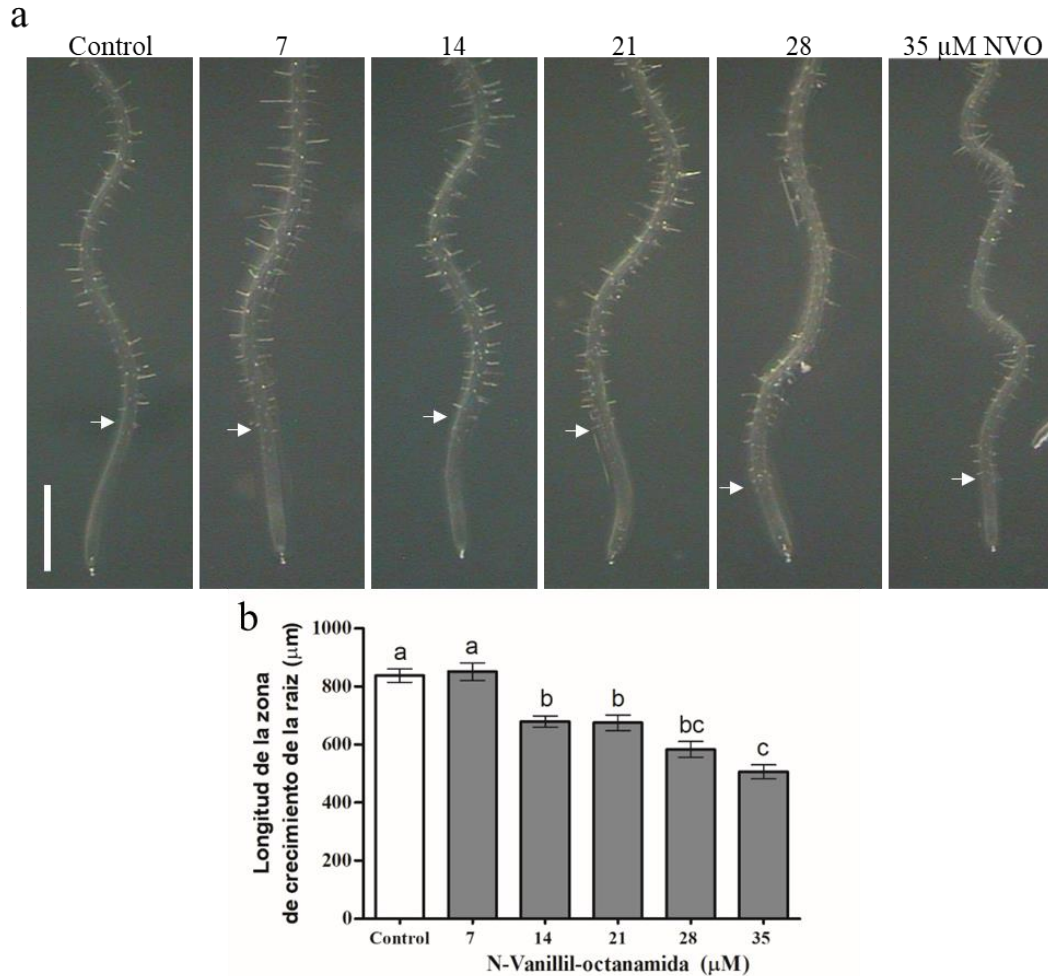


Figura 12. La N-vanillil-octanamida reduce la longitud de la zona meristemática y de elongación de la raíz primaria de *A. thaliana*. a) Efecto de la N-vanillil-octanamida sobre la longitud de la zona de crecimiento de la raíz primaria de plantas de 12 días de edad observadas por medio de microscopia tomada con estereoscopio con aumento de 1.5 veces. Las flechas muestran el inicio de la zona de diferenciación marcada por la aparición de pelos radiculares; la barra blanca indica la escala equivalente a 500 μm. b) Longitud de la zona de crecimiento de la raíz primaria expuesta a los distintos tratamientos de N-vanillil-octanamida (7, 14, 21, 28 y 35 μM) y DMSO como control. Las barras representan el promedio ± error estándar de 15 plantas, las letras indican las diferencias estadísticas determinadas a través de ANOVA y un análisis post-hoc de Tukey ($P < 0.05$).

La N-vanillil-octanamida inhibe la proliferación celular y la respuesta auxínica en el meristemo de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*.

La actividad mitótica del meristemo de la raíz primaria y por lo tanto su crecimiento está regulado principalmente por las auxinas (Lavenus *et al.*, 2013; Nam *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2021). Se realizaron análisis microscópicos detallados enfocados en evaluar la actividad mitótica del meristemo mediante la línea reportera de proliferación celular *CycB1::uidA*, en la cual la expresión de la beta glucuronidasa está bajo influencia del promotor del gen *ciclina b1* de la planta, la cual comienza su expresión en los últimos momentos de la fase G2 del ciclo celular y que tiene como pico máximo de expresión durante la mitosis. Los resultados muestran que la N-vanillil-octanamida disminuye la expresión de *CycB1::uidA* de manera dosis dependiente hasta inhibirse por completo en la concentración de 35 μM (**Figura 13a, paneles superiores**).

Posteriormente, se evaluó la actividad auxínica mediante la línea reportera inducible por auxinas *DR5::uidA* la cual consta de un promotor constitutivo sintético de respuesta auxínica unido a la región codificante de la β -glucuronidasa, dicho promotor responde a los factores transcripcionales ARF, por lo que en presencia de auxinas se activa la vía de señalización y la producción de la β -glucuronidasa. Los patrones de tinción azul que resultan de la actividad de la beta glucuronidasa indican que la respuesta auxínica disminuye a partir de la concentración de 21 μM de N-vanillil-octanamida, sin embargo, no se inhibe por completo a la concentración de 35 μM , por tanto, la N-vanillil-octanamida induce un aparente estado quiescente en el meristemo de la raíz, reduciendo la actividad auxínica a un nivel mínimo, que correlaciona con la inhibición de la actividad mitótica y del crecimiento de la raíz primaria (**Figura 13a, paneles inferiores**).

Adicionalmente, al determinar cuantitativamente el tamaño de la zona meristemática, se observó que la N-vanillil-octanamida disminuye la extensión de la zona de proliferación de la raíz primaria hasta un 67.77% para la concentración de 35 μM (**Figura 13b**), esto correlaciona con lo observado en el crecimiento de la raíz primaria y con la tasa de mitosis evidenciada por el marcador *CycB1::uidA*, demostrándose que el efecto del capsaicinoide sobre el crecimiento de la raíz primaria ocurre al restringir los procesos de proliferación celular.

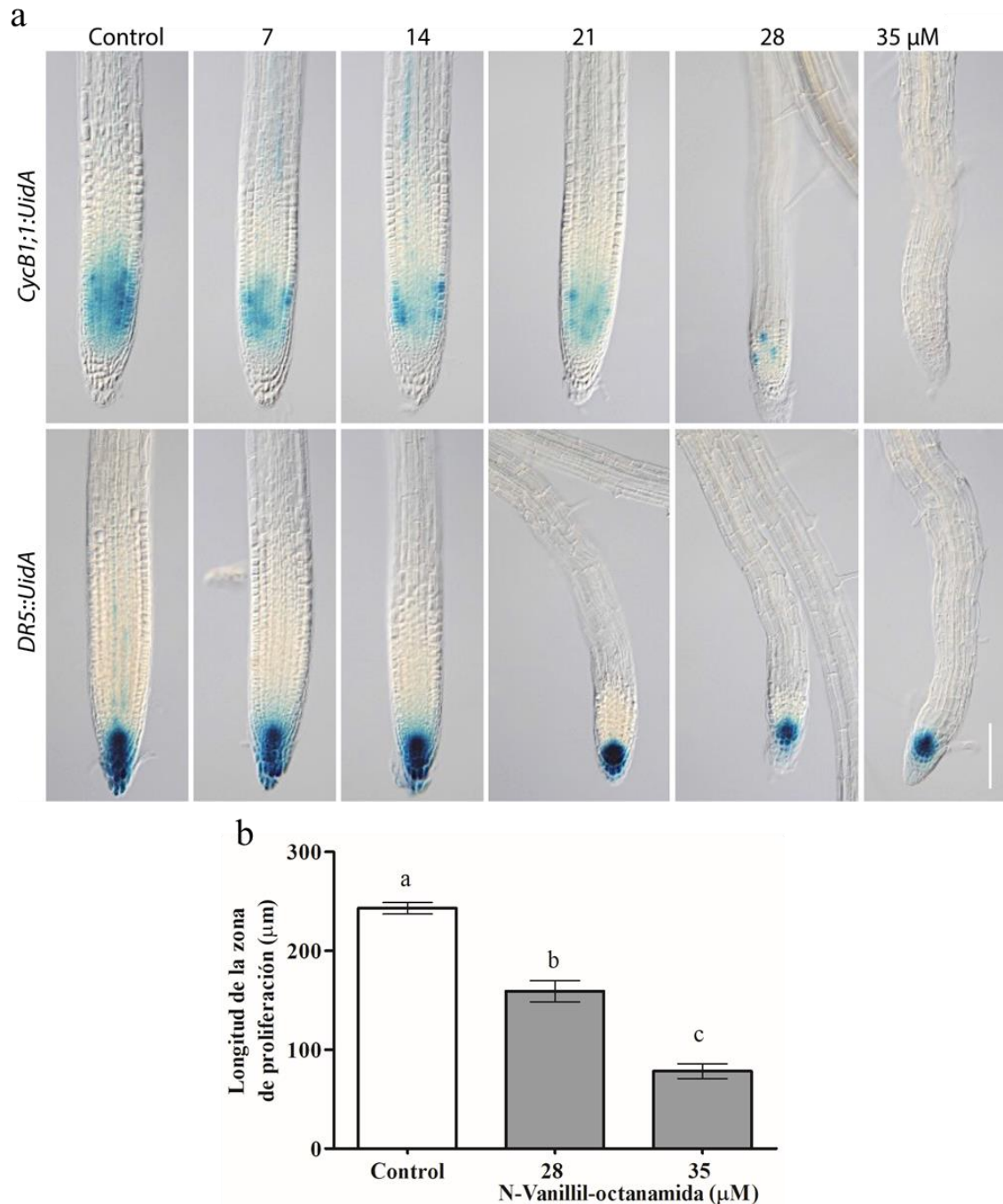


Figura 13. Inhibición de la actividad mitótica y respuesta auxínica producida por la N-vanillil-octanamida. a) Efecto de la N-vanillil-octanamida sobre plantas de 12 días de edad de la línea transgénica marcadora de proliferación celular *CycB1::uidA* (parte superior) y la línea transgénica marcadora de respuesta auxínica *DR5::uidA* (parte inferior) observados por medio de tinción histoquímica de GUS y microscopia de Nomarski en un aumento de 20 veces; la barra blanca representa la escala equivalente a 100 μm . b) Longitud de la zona de proliferación cuantificada a partir de la línea transgénica *CycB1::uidA* de plantas tratadas con 28 y 35 μM de N-vanillil-octanamida y DMSO como

control. Las barras representan el promedio \pm error estándar de 12 plantas, las letras indican las diferencias estadísticas determinadas a través de ANOVA y un análisis post-hoc de Tukey ($P < 0.01$).

La N-vanillil-octanamida altera la homeostasis de auxinas en el nicho de células iniciales

Los resultados anteriores, muestran que la N-vanillil-octanamida modula procesos asociados con la vía de señalización de las auxinas, lo que correlaciona con alteraciones en los niveles y distribución de esta hormona. Para profundizar en los mecanismos involucrados en modular los efectos de la N-vanillil-octanamida se evaluó el efecto de la N-vanillil-octanamida en 12 mutantes de genes que codifican para proteínas de diferentes componentes de la señalización auxínica. De este escrutinio se encontró que las plantas mutantes en *pin3* involucrada en el transporte auxínico de eflujo muestran tolerancia al efecto inhibitorio de la N-vanillil-octanamida sobre el crecimiento de la raíz primaria inhibiéndose solo un 13.6%, por otro lado, la mutante en un transportador de influjo *aux1-7* tiene mayor sensibilidad al N-vanillil-octanamida, ya que se inhibe en un 80% en comparación con el 62.6% de inhibición en Col-0 (**Figura 13**), es importante resaltar que estos elementos participan de forma indirecta en los procesos regulados por auxinas.

Por otro lado, aquellas mutantes de elementos que forman parte de la vía de señalización de auxinas (elementos directos), no presentaron una respuesta diferencial al compuesto, con excepción de la mutante *arf7/arf19*, que mostró una menor tolerancia a la acción del compuesto con una inhibición de 43.39%.

Adicionalmente se encontró que la línea transgénica *35S::YUC4* que sobre expresa a la proteína YUC4, la cual, es una de las enzimas responsables de la biosíntesis de las auxinas ya que cataliza la reacción de formación del ácido indol acético (principal auxina de las plantas) a partir del ácido indol pirúvico, mostró tolerancia al efecto de N-vanillil-octanamida sobre el crecimiento de la raíz, inhibiéndose un 22.2% en comparación con la planta silvestre Col-0 que se inhibió un 62.6% (**Figura 14**). En condiciones control *35S::YUC4* sobre produce auxinas en el nicho de células madre, aunado a un incremento de la señal auxínica (Munguía-Rodríguez *et al.*, 2020; Cao *et al.*, 2019), indicando que un

incremento en los niveles de auxinas puede restaurar el fenotipo inducido por la N-vanillil-octanamida.

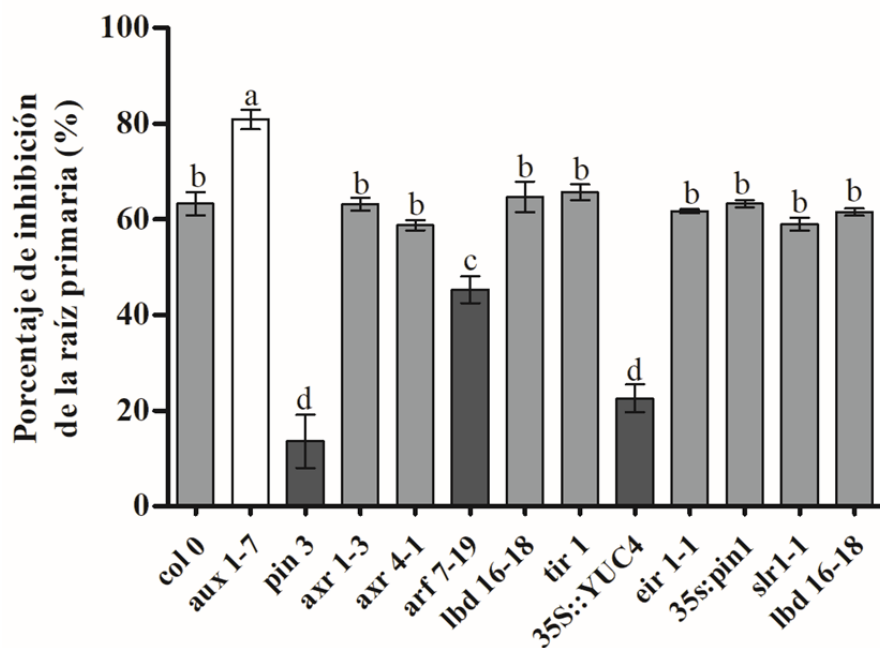


Figura 14. Efecto de la N-vanillil-octanamida sobre el crecimiento de la raíz primaria sobre líneas mutantes y transgénicas en la señalización auxínica. Porcentaje de inhibición producido por N-vanillil-octanamida 35 μ M comparado con el crecimiento control de las distintas líneas mutantes y transgénicas; las barras representan el promedio \pm error estándar de 15 plantas por línea mutante y transgénica que crecieron en medio MS 0.2x durante 12 días, las letras indican las diferencias estadísticas determinadas a través de ANOVA y un análisis post-hoc de Tukey ($P < 0.01$).

Análisis fisiológicos detallados de las mutantes en elementos de transporte auxínico *pin3* y *aux1-7* muestran una respuesta contrastante entre ellas. Por un lado, la línea mutante *pin3* mostró una resistencia, ya que el crecimiento de la raíz primaria únicamente se inhibió en un 13.24% en comparación con las plantas silvestres (**Figura 15 a y c**). Los análisis histológicos mediante la tinción con lugol que permite discernir la estructura general del meristemo y la diferenciación celular en la cofia de la raíz primaria, muestran que los meristemas de la mutante *pin3* conserva una estructura y organización comparable con las plantas crecidas bajo condiciones control aún en las concentraciones de 28 como de 35 μ M

de N-vanillil-octanamida (**Figura 15 b**). La línea mutante *pin3* carece de un transportador de eflujo de auxinas de la familia de transportadores PIN-FORMED; la familia de genes que codifican para dichas proteínas tiene una expresión sumamente localizada, de tal manera que cada proteína PIN-FORMED se encuentra de forma específica en diferente tejido permitiendo de esta forma un transporte polarizado de las auxinas (Michniewicz *et al.*, 2007; Křeček, *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2019). Específicamente la proteína transportadora PIN3 se expresa y localiza en las células iniciales de la columela en el meristemo, y se caracteriza por ser uno de los primeros transportadores que vierten a las auxinas de su lugar de producción el nicho de células madre, por tanto, la presencia de este transportador permite iniciar el flujo de manera basipetal en la columela para posteriormente por medio de otros transportadores como PIN2 y PIN7 producir un flujo acropetal en forma de cascada invertida hacia tejidos superiores donde las auxinas cumplirán funciones como la formación de raíces laterales y pelos radiculares (Michniewicz *et al.*, 2007; Lavenus *et al.*, 2013; Leyser, 2005; Ying-Hua *et al.*, 2011). Interesantemente, la mutante *eir1-1* que carece de la proteína PIN2 que se expresa en las células de la capa lateral del meristemo de la raíz y de la epidermis, no presentó una inhibición diferencial con respecto a la línea silvestre (datos no mostrados), lo que resalta la importancia de la proteína PIN3 para el funcionamiento del meristemo.

Caso contrario, la mutante *aux1-7* presentó hipersensibilidad a la acción del compuesto ya que el crecimiento de la raíz primaria alcanza un 72.32% de inhibición desde la concentración de 28 μ M y en 35 μ M se inhibe aproximadamente un 20.81% más que la línea silvestre (**Figura 15 a y c**). El análisis microscópico de la mutante *aux1-7* con un tratamiento de 28 μ M presenta un daño similar a Col-0, sin embargo, en 35 μ M, se observa pérdida de la estructura meristemática lo que indica un agotamiento y el cese de crecimiento de la raíz primaria (**Figura 15b**). La línea mutante *aux1-7* carece de un transportador de influjo de auxinas de la familia de transportadores AUX/LAX que al igual que la familia de genes y proteínas PIN-FORMED se encuentran localizadas de manera específica en los diferentes tejidos pero transportando a las auxinas en sentido inverso, es decir, mientras que las proteínas PIN se encargan de expulsar a las auxinas del interior de la célula, las proteínas AUX/LAX tienen la función de introducirlas y por ende se complementan para llevar a cabo los gradientes adecuados y por lo tanto la homeostasis de

las auxinas (Niu *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015; Péret *et al.*, 2012; Swarup y Bhosale, 2019). En el caso particular de la proteína AUX1 esta se localiza en la columela y la vasculatura de la planta por lo que la carencia de esta proteína en la mutante impediría que las auxinas se distribuyan en el nicho de células iniciales y zonas aledañas, disminuyendo la concentración de las auxinas dentro de las células donde cumplirían su función.

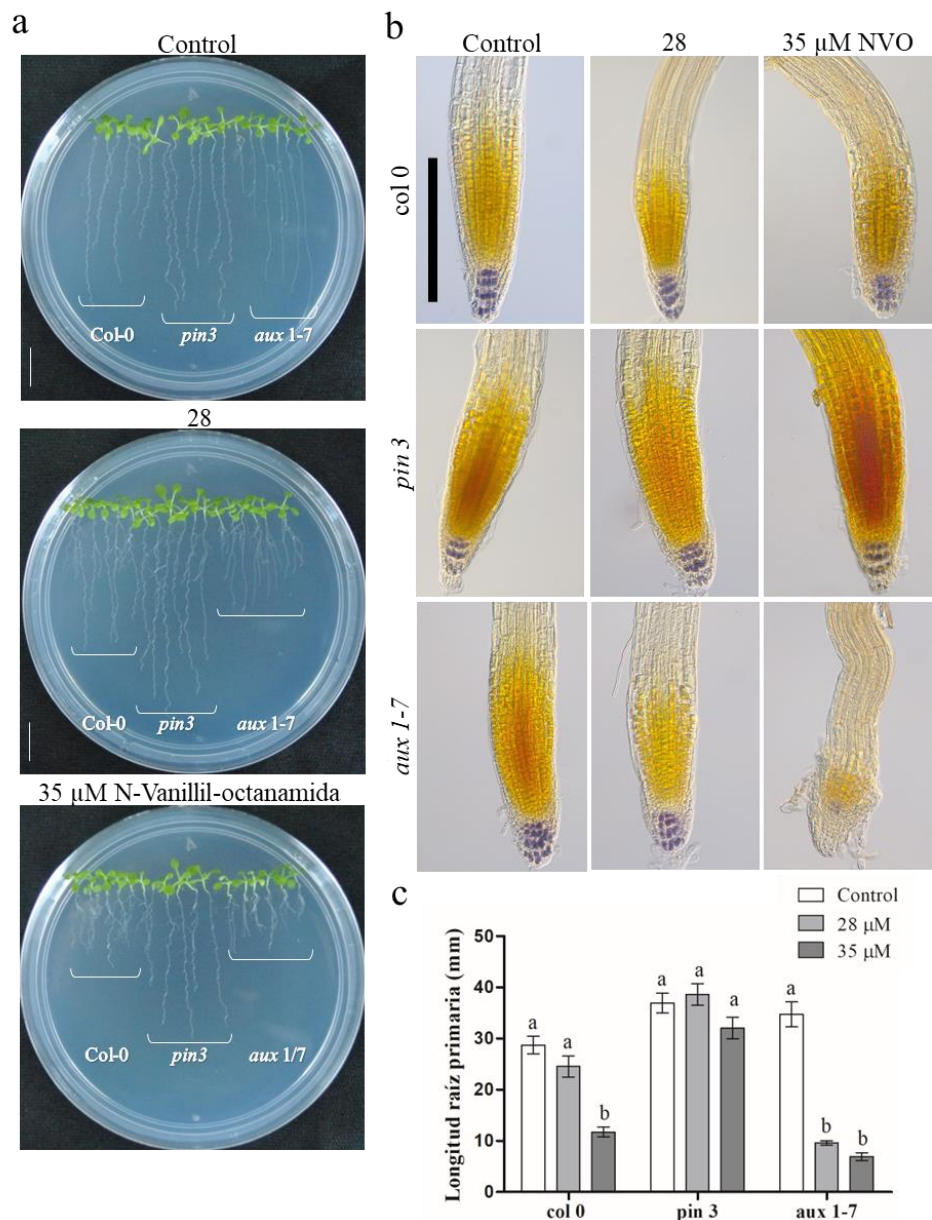


Figura 15. Las líneas mutantes responsables del transporte auxínico basipetal responden diferencialmente a la N-vanillil-octanamida siendo *pin3* (transporte eflujo) resistente y *aux1-7* (transporte influjo) hipersensible. a) Efecto comparativo de tratamientos con N-vanillil-octanamida 28 y 35 μ M, y DMSO como control durante 12 días

sobre plantas de la línea silvestre col 0 contra las líneas mutantes *pin3* y *aux1-7*; la barra blanca representa la escala equivalente a 1 cm. b) Microscopia Nomarski de la raíz primaria utilizando la tinción con lugol de los tratamientos anteriores en un aumento de 20 veces; la barra negra representa la escala equivalente a 200 μm . c) Longitud de la raíz primaria comparando el crecimiento de la línea col 0 contra *pin3* y *aux1-7* expuestas a tratamientos con N-vanillil-octanamida y DMSO como control. Las barras representan el promedio \pm error estándar de 18 plantas, las letras indican las diferencias estadísticas determinadas a través de ANOVA y un análisis post-hoc de Tukey ($P < 0.01$).

La caracterización detallada de la línea sobreexpresora de YUC4 al efecto de la N-vanillil-octanamida muestra la resistencia a la inhibición del crecimiento de la raíz primaria, esto correlacionado con la integridad de su meristemo en comparación con las plantas Col-0 (**Figura 16a-c**).

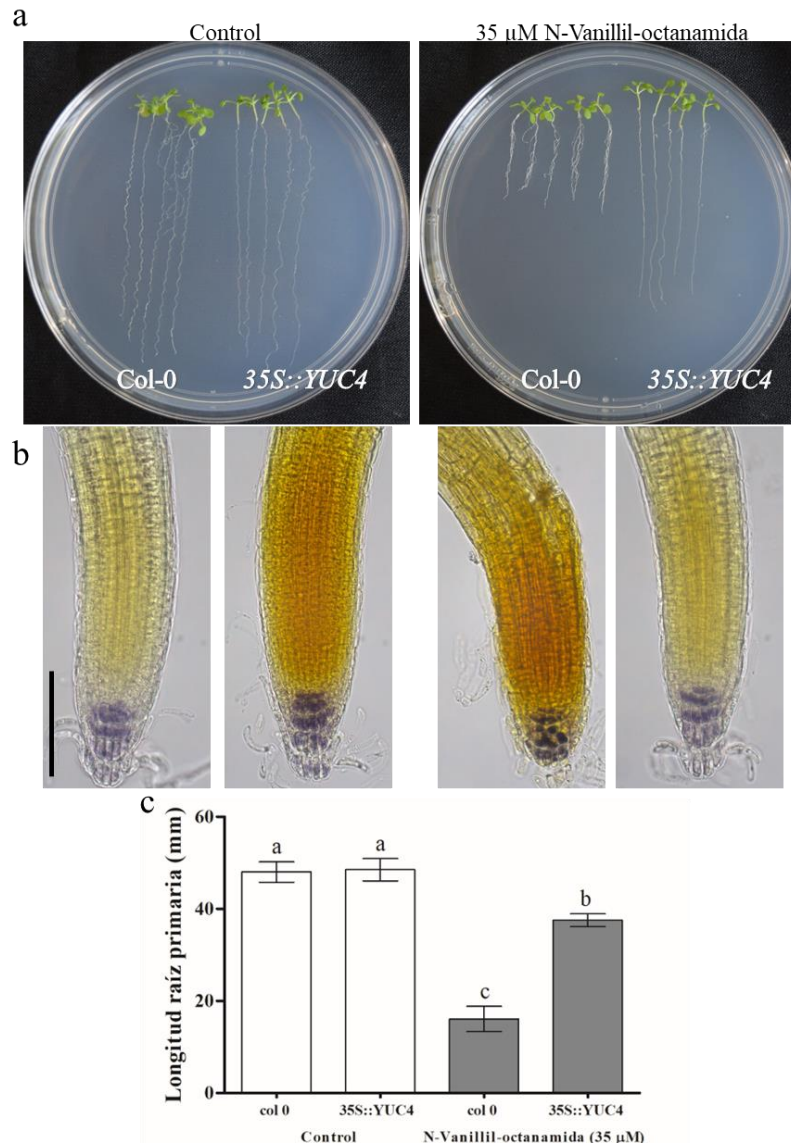


Figura 16. La línea transgénica sobreproductora de auxinas 35S::YUC4 es resistente al efecto de N-vanillil-octanamida. Efecto comparativo de tratamientos con N-vanillil-octanamida 35 μ M y DMSO como control durante 12 días sobre plantas de la línea silvestre Col 0 contra la línea transgénica 35S::YUC4; la barra blanca representa la escala equivalente a 1 cm. b) Microscopia de Nomarski de la raíz primaria utilizando la tinción con lugol de los tratamientos anteriores en un aumento de 20 veces; la barra negra representa la escala equivalente a 100 μ m. c) Longitud de la raíz primaria comparando el crecimiento de la línea col 0 y 35S::YUC4 expuestas a tratamiento con N-vanillil-octanamida. Las barras representan el promedio \pm error estándar de 15 plantas, las letras indican las diferencias estadísticas determinadas a través de ANOVA y un análisis post-hoc de Tukey ($P < 0.01$).

Considerando los resultados anteriores podemos observar que existe una correlación entre la función que desempeñan PIN3, AUX1 y YUCCA4 y la sensibilidad a N-vanillil-octanamida; estas proteínas se encuentran relacionadas en cuanto a su localización en la raíz la cual es el nicho de células madre y sus alrededores manteniendo la homeostasis de auxinas en dicho tejido, lo cual nos hace suponer que la N-vanillil-octanamida posee un efecto sobre los niveles de auxinas en el nicho de células iniciales en donde aparentemente los reduce como se ha observado con la línea transgénica *DR5::uidA* y que no posee un efecto directo sobre la señalización de esta hormona (Kriechbaumer *et al.*, 2016; Michniewicz *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2019). Por un lado, la mutante *pin3* al no tener este componente impediría el flujo de la hormona y permitiría la acumulación de auxinas en el nicho de células fuente impidiendo que los niveles en esta zona bajen (**Figura 17**), teniendo relación con la línea transgénica *35S::YUC4* la cual, al tener una sobreproducción de la enzima responsable de la biosíntesis de auxinas permitiría incrementar de igual forma los niveles de esta fitohormona en esa misma zona (**Figura 17**); caso contrario la mutante *aux1-7* impediría que las auxinas entren a las células bloqueando el flujo de auxinas y disminuyendo sus niveles en el interior de las células (**Figura 17**), conduciendo a un fenotipo exacerbado al compararlo con el control, ya que si el capsaicinoide disminuye los niveles de auxinas en conjunto con la mutación producirían la hipersensibilidad observada. Estos resultados correlacionan con los obtenidos en otras investigaciones donde se han realizado cruza de mutantes deficientes en la biosíntesis de auxinas (ya sea que carecen de alguna proteína YUC o TAA, principales proteínas responsables de la biosíntesis de auxinas) con proteínas de transporte. Brumos y col. (2018) realizaron cruza de la mutante *wei8* carente de la proteína TAA1 responsable de la biosíntesis de ácido indol pirúvico, un precursor de auxinas, con mutantes de distintos transportadores entre ellas *pin3* y *aux1*, observando que en la mutante *pin3* se impide el daño por la mutación de *wei8* mientras que la mutante *aux1* lo potencia, siendo esto un resultado similar al encontrado con el capsaicinoide. En otro estudio, Nishimura y col. (2013) analizaron el compuesto yucasin, un inhibidor de las proteínas YUC, observaron que la línea transgénica *35S::YUC1* la cual es sobreexpresora de YUC1 resulta resistente a la inhibición por este compuesto en comparación a la línea silvestre Col-0.

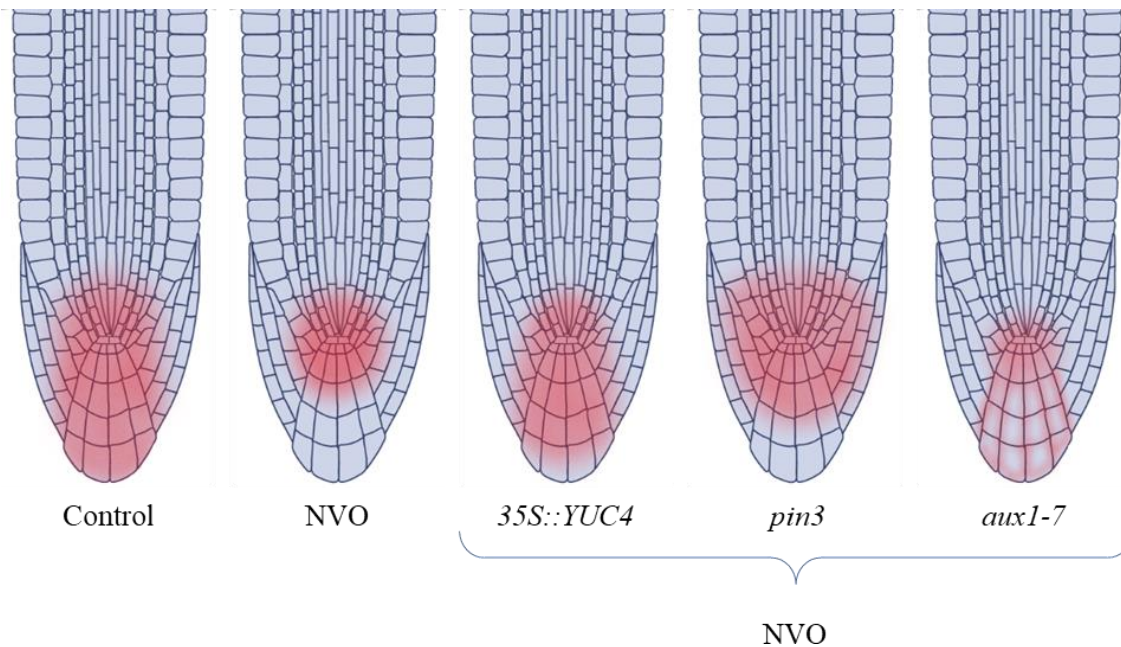


Figura 17. La N-vanillil-octanamida afecta la homeostasis de auxinas en el meristemo apical de la raíz. Representación del efecto de la N-vanillil-octanamida sobre los niveles y distribución de las auxinas en la raíz de las distintas líneas de *A. thaliana* que mostraron un efecto diferencial a la acción del compuesto respecto a Col-0. El color rojo representa la distribución de las auxinas.

Tratamientos con auxinas exógenas y precursores de su síntesis disminuyen los efectos de la N-vanillil-octanamida en la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*

Con los resultados anteriores que sugieren que la N-vanillil-octanamida pudiera estar funcionando como un inhibidor de la biosíntesis de auxinas o bien que este reduce los niveles de auxinas en el nicho de células fuente al alterar su transporte, se decidió llevar a cabo un análisis de complementación química con el fin de determinar si el efecto inhibitorio producido por el capsaicinoide puede ser revertido manteniendo los niveles de auxinas. Para ello se determinó el efecto del N-vanillil-octanamida en plantas suplementadas con dos auxinas una natural el ácido indol acético (IAA) y una sintética el ácido naftalen acético (NAA), un bloqueador de eflujo auxínico, el ácido naftil ftalamico (NPA) y un precursor de la biosíntesis de auxinas, el triptófano.

Se utilizaron estas hormonas de forma exógena suplementadas en el medio en conjunto con el capsaicinoide con el fin de elevar los niveles auxínicos en la raíz y tratar de compensar la

disminución de la respuesta auxínica generada con el compuesto. De manera macroscópica en promedio la longitud de raíz primaria en el caso de los tratamientos combinados de IAA con la N-vanillil-octanamida se incrementó ligeramente, sin embargo, al igual que el tratamiento combinado con NAA no presentan diferencias estadísticas significativas respecto al tratamiento únicamente con el compuesto capsaicinoide (**Figura 18 a**), sin embargo, en los análisis microscópicos de las líneas transgénicas *CycB1::uidA* y *DR5::uidA*, se puede observar una restauración e incremento de la expresión de la *ciclina B1* y en consecuencia una restauración en la actividad mitótica (**Figura 18 b**); también hubo una restauración en la respuesta auxínica evidenciada el marcador *DR5:uidA* (**Figura 18 c**), para el caso de los tratamientos con el NPA si restaura el crecimiento de la raíz primaria, inclusive el fenotipo observable se asemeja al inducido por el NPA y no el fenotipo del capsaicinoide (**Figura 18 a**); de manera microscópica las diferencias apreciables entre el tratamiento de NPA y la combinación con N-vanillil-octanamida es un meristemo con un mayor tamaño en la sección transversal y una ligera disminución de la zona de proliferación celular (**Figura 18 b-c**).

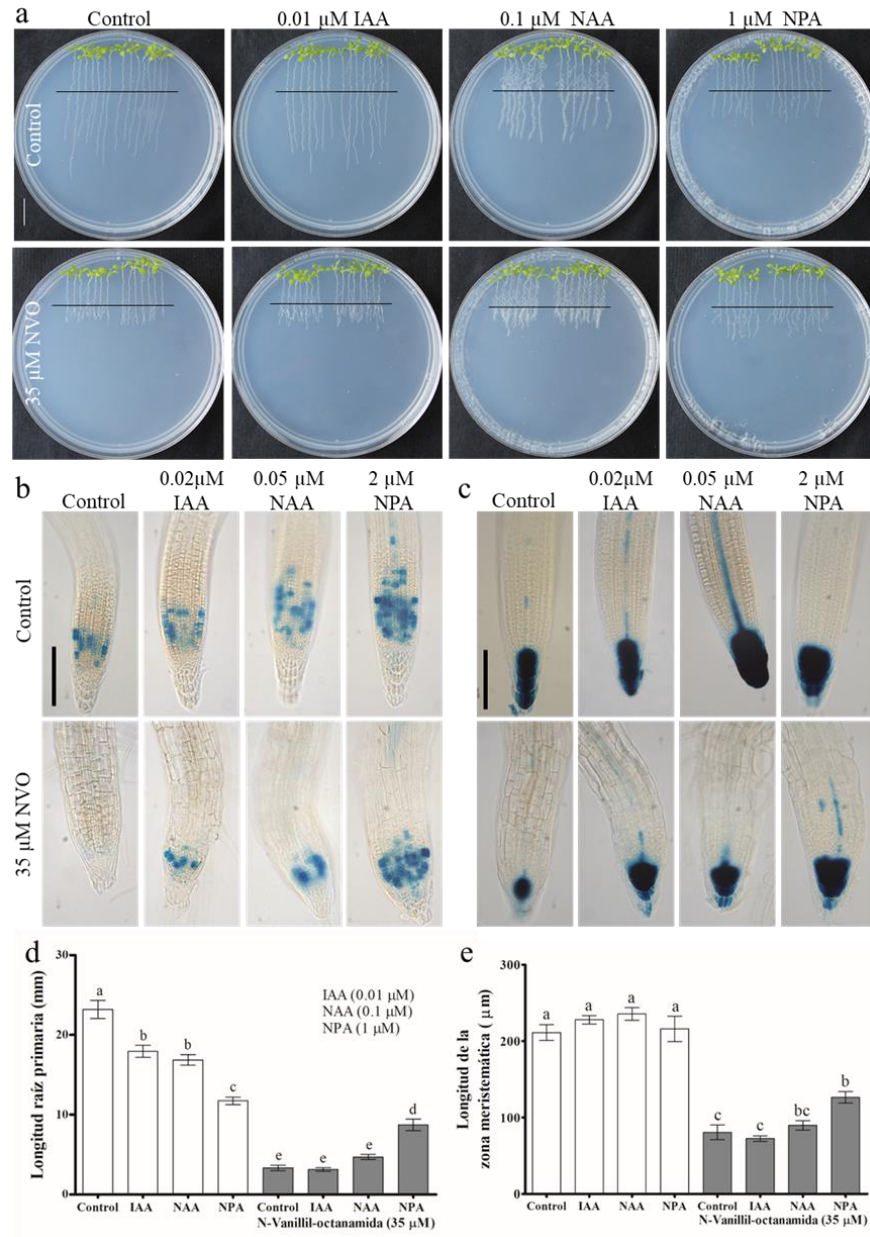


Figura 18. Las auxinas exógenas o el bloqueo del flujo auxínico amortiguan el efecto producido por la N-vanillil-octanamida. a) Ensayo de complementación química sobre plantas de las líneas transgénicas *CycB1::uida* y *DR5::uida* usando tratamientos combinados de N-vanillil-octanamida con IAA, NAA o NPA; en los paneles superiores se observan las condiciones controles, tanto positivo como negativo y en los paneles inferiores se muestra los tratamientos con el capsaicinoide y la combinación con el resto de moléculas. La línea negra representa el crecimiento durante la transferencia y la barra blanca representa la escala equivalente a 1 cm. Las plantas fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2x durante 5 días, posteriormente transferidas y crecidas en los tratamientos, después de 7 días, fueron analizadas. b) Micrografías representativas capturadas con microscopía Nomarski usando la tinción GUS en un aumento de 20 veces de la línea

CycB1::uidA. c) Microscopia Nomarski usando la tinción GUS en un aumento de 20 veces de la línea *DR5::uidA*. b) y c) Las barras negras representan la escala equivalente a 100 μm . d) Crecimiento de la raíz primaria después de la transferencia del ensayo de complementación química. e) Longitud de la zona meristemática. Las barras representan el promedio \pm error estándar de 20 plantas, las letras indican las diferencias estadísticas determinadas a través de ANOVA y un análisis post-hok de Tukey ($P < 0.01$).

El triptófano, principal precursor para la principal vía de producción de auxinas, logra restaurar de una mejor forma los defectos causados por el capsaicinoide en comparación con las auxinas exógenas o el NPA, llegándolo restaurar por completo (**Figura 19a y b**). Adicionalmente, este ensayo fue realizado en las mutantes *pin3* y *aux1-7* las cuales muestran resistencia e hipersensibilidad respectivamente al compuesto, los tratamientos con triptófano revierten el efecto de la N-vanillil-octanamida en las tres líneas sin mostrarse diferencias significativas en el tratamiento de 35 μM incluso en la mutante *aux1-7* (**Figura 19 a y c**).

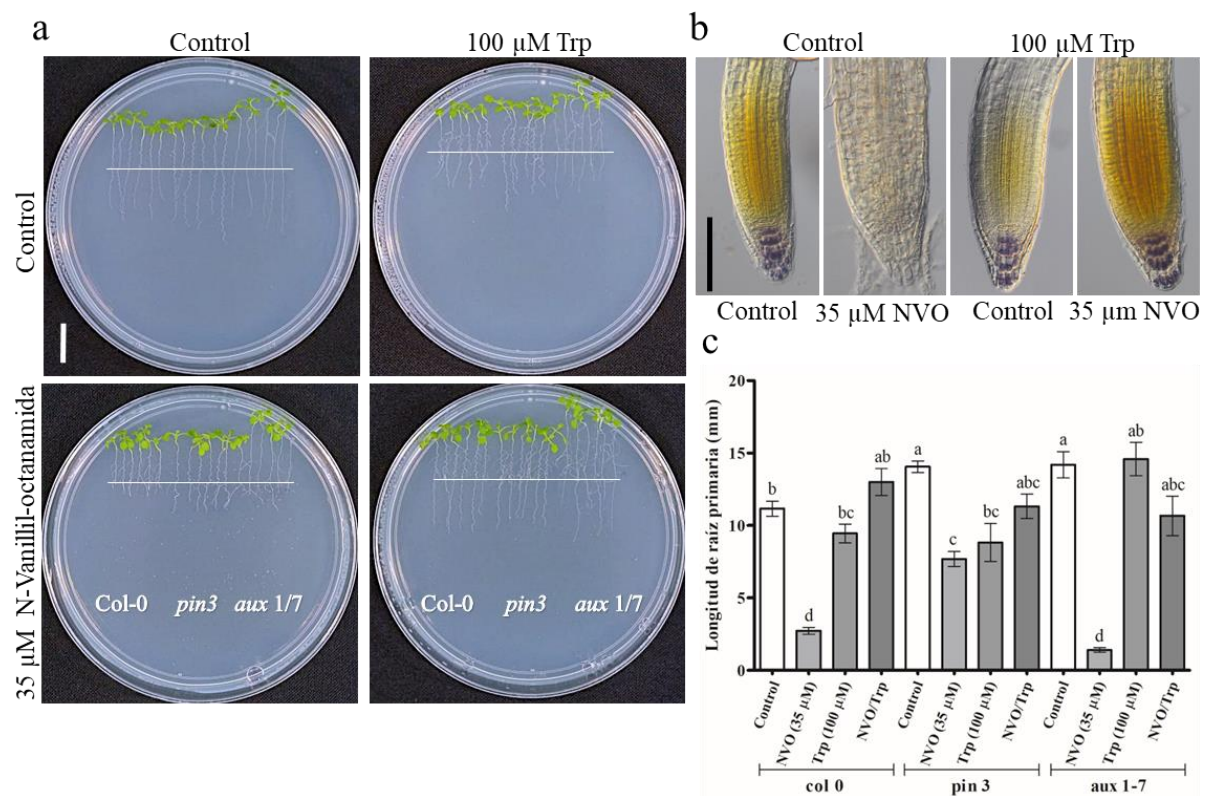


Figura 19. El triptófano inhibe el efecto producido por la N-vanillil-octanamida. a) Ensayo de complementación química sobre plantas de la línea silvestre Col 0 y las mutantes

pin3 y *aux1-7* usando tratamientos combinados de N-vanillil-octanamida con Trp. La línea blanca horizontal muestra el crecimiento durante la transferencia y la barra blanca representa la escala equivalente a 1 cm. Las plantas fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2x durante 5 días, posteriormente trasferidas y crecidas en los tratamientos, después de 5 días, fueron analizadas. b) Micrografías representativas de la línea silvestre Col-0 del ensayo de complementación química con triptófano, las micrográficas fueron capturadas con microscopia de Nomarski usando la tinción con lugol con un aumento de 20 veces. La barra negra representa la escala equivalente a 100 μm . c) Crecimiento de la raíz primaria después de la transferencia del ensayo de complementación química. Las barras representan el promedio \pm error estándar de 20 plantas, las letras indican las diferencias estadísticas determinadas a través de ANOVA y un análisis post-hok de Tukey ($P < 0.01$).

De manera microscópica el meristemo logra recuperar completamente su integridad, lográndose observar todas las células que los conforman además de conservar sus distintos tejidos intactos (**Figura 20b**). Nuevamente y como ocurre con el resto de compuestos, el triptófano logra restaurar la señal de los marcadores de las líneas transgénicas *CycB1::uidA* y *DR5::uidA* incluso incrementarlas ligeramente respecto al control, sin embargo, a diferencia de los otros tres compuestos en el caso de la línea *CycB1::uidA* la señal mostrada por el marcador guarda más correlación con el crecimiento de la raíz donde al haber una mayor cantidad de células en proceso de mitosis se observa una mayor longitud de raíz primaria (**Figura 20 a-b**). Otro rasgo a resaltar es que al parecer las distintas zonas de crecimiento de la raíz conservan su tamaño en el tratamiento combinado (**Figura 21a**).

Estudios de complementación química como el realizado por Zhu y col. (2019) observan que al analizar la respuesta a etileno (que a su vez guarda relación con la respuesta auxínica), plantas de Col-0 pueden volverse insensibles a la actividad del etileno cuando son expuestas a un inhibidor de biosíntesis de auxinas en la proteínas YUCCA (Ponalrestat), pero cuando se les añade triptófano se restablece parcialmente la actividad del etileno y por ende la actividad auxínica, dando un resultado semejante al obtenido en este trabajo donde agregar triptófano logra restaurar la actividad auxínica.

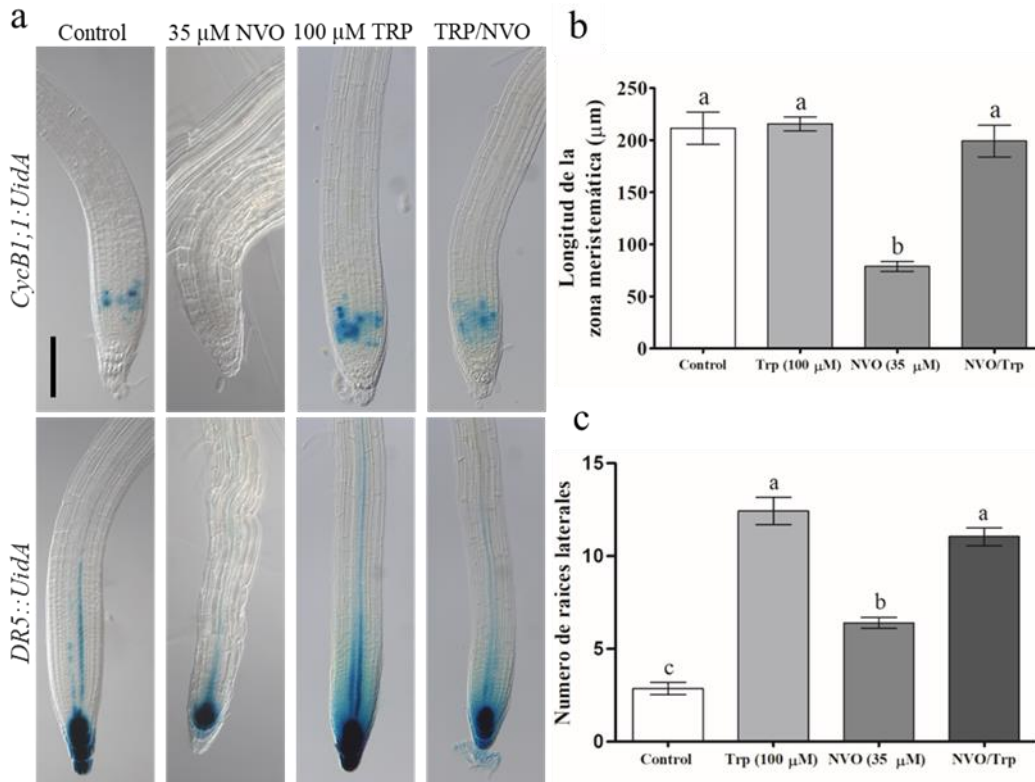


Figura 20. El triptófano restablece la actividad mitótica y auxínica inhibida por la N-vanillil-octanamida. a) Ensayo de complementación química sobre plantas de las líneas transgénicas marcadoras *CycB1::uidA* y *DR5::uidA* usando tratamientos combinados de N-vanillil-octanamida con Trp, se muestran micrografías representativas de dichas líneas teñidas por medio de la tinción GUS que fueron capturadas con microscopia Nomarski en un aumento de 20 veces. Las plantas fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2x durante 5 días, posteriormente trasferidas y crecidas en los tratamientos, después de 5 días, fueron analizadas. La barra negra representa la escala equivalente a 100 μm. b) Crecimiento de la raíz primaria después de la transferencia del ensayo de complementación química. c) Número de raíces laterales del ensayo de complementación química con Trp sobre las líneas transgénicas. Las barras representan el promedio ± error estándar de 20 plantas, las letras indican las diferencias estadísticas determinadas a través de ANOVA y un análisis post-hoc de Tukey (P<0.01).

Todos los resultados obtenidos en el ensayo de complementación química continúan arrojando nueva evidencia de que la N-vanillil-octanamida funciona como un inhibidor en la biosíntesis de las auxinas en el nicho de células madre.

La N-vanillil-octanamida modifica la expresión del gen de biosíntesis de auxinas antranilato sintasa

La línea transgénica *pASA::GUS* marca la expresión de la proteína antranilato sintasa la cual es una enzima responsable de la síntesis de antranilato que es el precursor necesario para la biosíntesis del triptófano, dicha enzima se expresa principalmente en el meristemo distal de la raíz. Bajo tratamiento con N-vanillil-octanamida el marcador de la línea reportera *pASA::GUS* aumenta (**Figura 21a**), esto concuerda con lo reportado en otros trabajos donde la inhibición de la respuesta auxínica o disminución de los niveles de auxinas en la raíz estimula la expresión de genes de proteínas de biosíntesis de auxinas como YUC, TAA1, TAR2, WEI2, etc., esto podría deberse a que la planta trata de compensar la baja en los niveles de auxinas si es que este esté funcionando como un inhibidor de la biosíntesis de auxinas (Zhu *et al.*, 2019; Dziewit *et al.*, 2021; Di *et al.*, 2021).

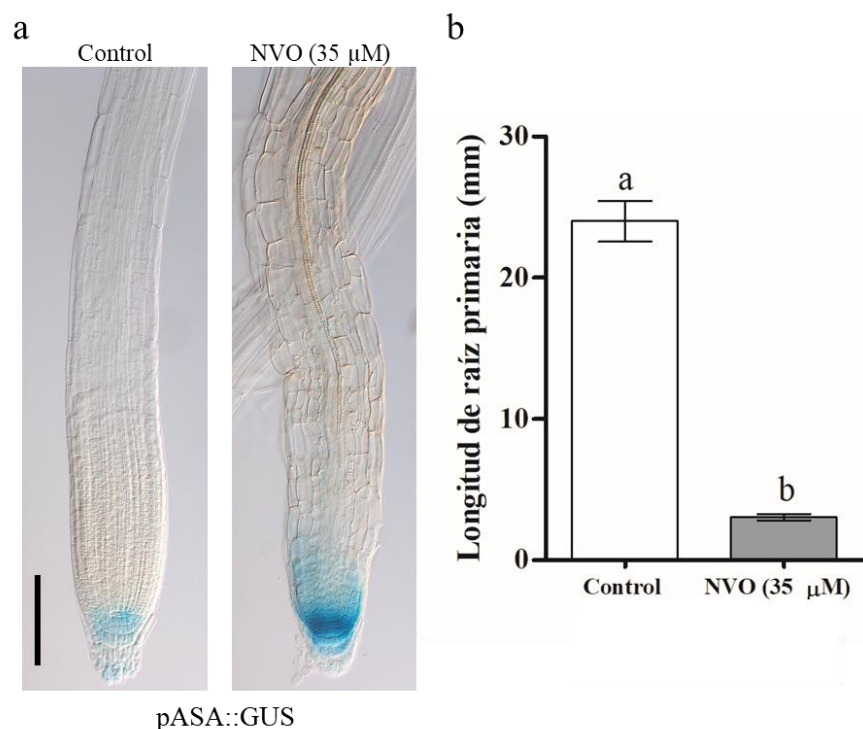


Figura 21. N-vanillil-octanamida estimula la expresión del gen de la antranilato sintasa. a) Micrografías de la línea transgénica marcadora *pASA::GUS* sometidas a tratamientos con N-vanillil-octanamida, las micrografías fueron capturadas con microscopía de Nomarski usando la tinción GUS con un aumento de 20 veces. Las plantas

fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2x durante 5 días, posteriormente trasferidas y crecidas en los tratamientos, después de 5 días, fueron analizadas. La barra negra representa la escala equivalente a 100 μm . b) Longitud de la raíz primaria de la línea transgénica mencionada expuesta al capsaicinoide. Las barras representan el promedio \pm el error estándar de 18 plantas por línea transgénica, las letras indican las diferencias estadísticas determinadas a través de ANOVA y un análisis post-hoc de Tukey ($P < 0.01$).

La N-vanillil-octanamida produce un efecto sitio específico sobre el meristemo radicular de la raíz de *Arabidopsis thaliana*

Hasta el momento la mayoría de los resultados nos dan un indicio de que el efecto del capsaicinoide se encuentra dirigido al sistema radicular de la planta, pero también específicamente al meristemo de la raíz en el nicho de células madre y las células iniciales de cada tejido, por ello se decidió realizar tratamientos en los cuales únicamente se expusiera la región basal o la región apical de la raíz primaria (aproximadamente 0.5 mm) con tratamiento de 35 μM de capsaicinoide. Los tratamientos control y 35 μM de N-vanillil-octanamida muestran crecimiento normal de las plantas o bien el fenotipo inducido por el compuesto, respectivamente. Los tratamientos donde solo la punta de la raíz estaba en contacto con del capsaicinoide muestran la disminución en el crecimiento de la raíz primaria muy similar a los tratamientos donde toda la planta está en tratamiento con N-vanillil-octanamida con porcentajes de inhibición del 60.8% y 82.6%, respectivamente (**Figura 22 a y c**). De manera interesante, en aquellas plantas cuya región basal era la expuesta al capsaicinoide no se afectó el crecimiento de la raíz primaria (**Figura 22 a y c**). Los análisis microscópicos soportan los resultados mencionados, que en comparación con las plantas crecidas en condiciones control como las que están en contacto total con el capsaicinoide, las plantas cuyo meristemo es el expuesto al capsaicinoide muestran disminución en la actividad mitótica y la señalización auxínica mientras que en las que la región basal de la planta es la expuesta el meristemo de la raíz no muestra cambios en estos parámetros respecto al control negativo (**Figura 22 d**). Estos resultados indican que el sitio de acción del compuesto N-vanillil-octanamida es en el meristemo radicular de la raíz primaria.

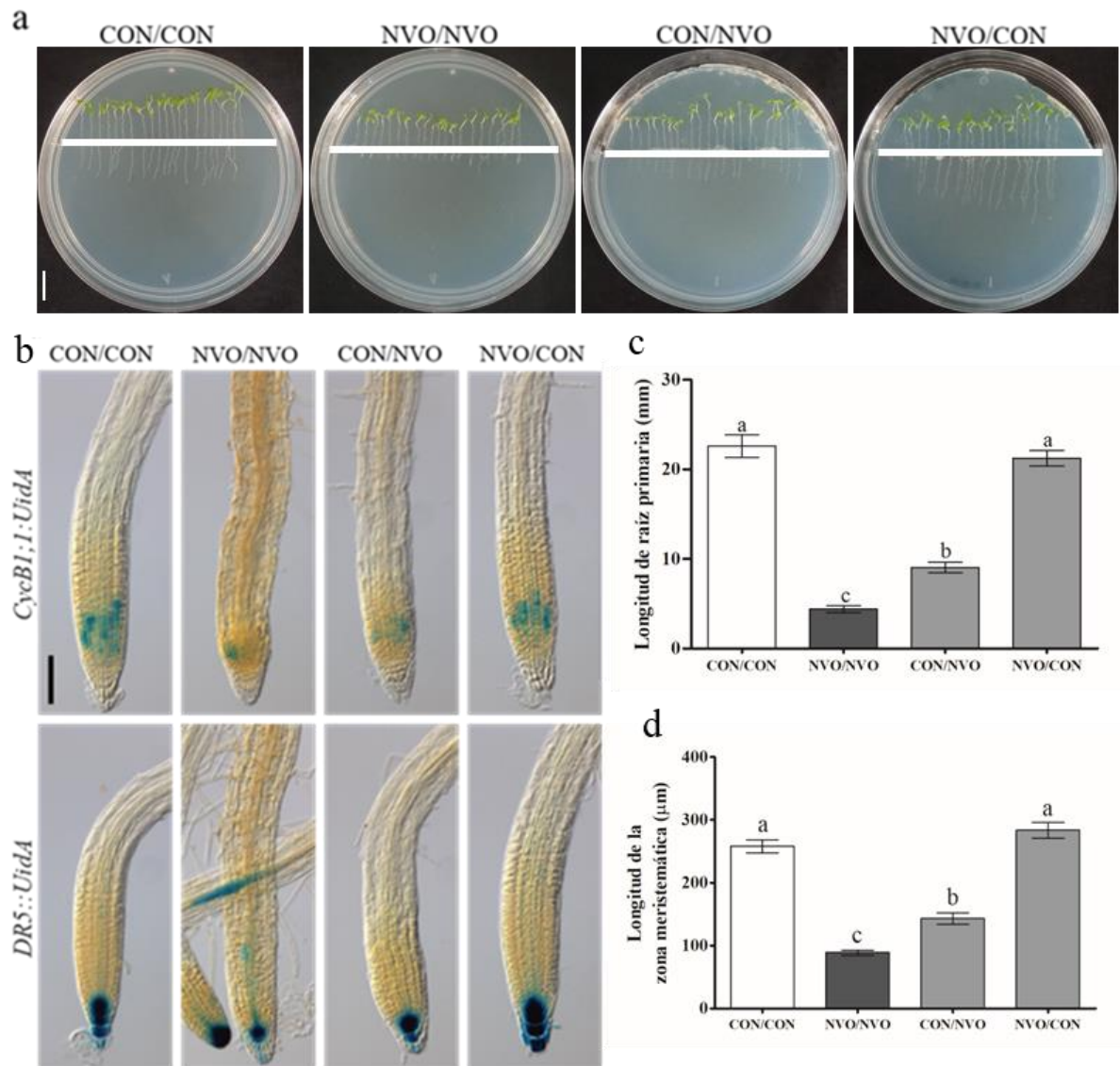


Figura 22. El mecanismo de acción de la N-vanillil-octanamida es sitio específico, actuando a nivel del meristemo de la raíz. a) Exposición parcial de la N-vanillil-octanamida sobre plantas de las líneas transgénicas marcadoras *CycB1::uidA* y la *DR5::uidA*. Las plantas fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2x durante 5 días, posteriormente trasferidas y crecidas en cajas Petri con secciones de medio MS con diferente tratamiento en donde la punta de la raíz (aproximadamente 0.5 mm) fue colocada en una de las secciones del medio y el resto de la planta en otra, después de 5 días de crecimiento fueron analizadas. La línea blanca horizontal muestra la división entre las secciones de agar y la barra blanca representa la escala equivalente a 1 cm. b) Micrografías representativas capturadas con microscopia de Nomarski usando la tinción GUS con un aumento de 20 veces de *CycB1::uidA* y la *DR5::uidA*. La barra negra representa la escala equivalente a 100 µm. c) Longitud de la raíz primaria de las líneas transgénicas usadas en tratamientos por exposición parcial. d) Longitud de la zona meristemática. Las barras representan el promedio \pm error estándar de 18 plantas por línea transgénica, las letras

indican las diferencias estadísticas determinadas a través de ANOVA y un análisis post-hoc de Tukey ($P < 0.01$).

CONCLUSIONES

Con los datos mostrados se propone un modelo de acción del capsaicinoide (**Figura 23**) que se soporta por las siguientes conclusiones:

-La N-vanillil-octanamida produce un efecto de hormesis en el crecimiento y desarrollo de las plantas; dicho efecto en concentraciones bajas se caracteriza por aumentar el crecimiento de la raíz primaria e inducir ligeramente la formación de raíces laterales, mientras que en concentraciones altas disminuye el crecimiento de la raíz primaria hasta inhibirlo por completo, pero continuando con el crecimiento y desarrollo de las raíces laterales.

-El efecto en el crecimiento de la raíz primaria resulta por la inhibición de la proliferación celular en el meristemo, esto relacionado con la inhibición de la señalización de auxinas.

-El mecanismo de acción de la N-vanillil-octanamida sobre la homeostasis de las auxinas, es llevado a cabo a nivel de biosíntesis esto afecta niveles máximos necesarios en el nicho de células madre para la correcta actividad en el meristemo de la raíz.

-La mutación en el gen *pin3* sugiere que la salida de las auxinas del nicho de células madre se bloquea manteniendo gradiente adecuados para la actividad meristemática.

-Al incrementar tanto genéticamente como químicamente los niveles de auxinas en la raíz revierten el efecto inhibitorio de la raíz primaria causado por el capsaicinoide.

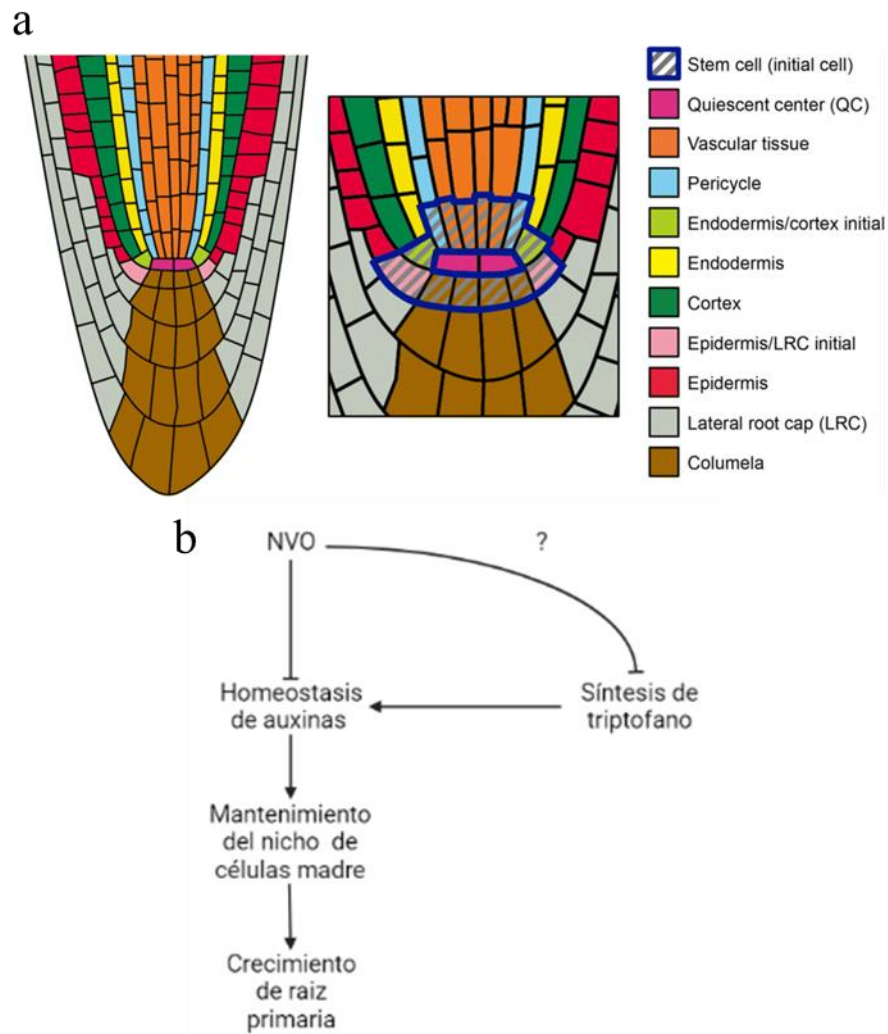


Figura 23. La N-vanillil-octanamida inhibe la biosíntesis de auxinas regulando negativamente la homeostasis auxínica en el nicho de células madre del meristemo apical de la raíz. a) Nicho de células madre en el meristemo apical de la raíz. b) Mecanismo de acción propuesto para la N-vanillil-octanamida sobre el sistema radicular de *A. thaliana*

PERSPECTIVAS

Los hallazgos de este trabajo muestran que la inhibición del crecimiento de la raíz primaria por el N-vanillil-octanamida dependiente de la señalización de auxinas puede ser revertida al mantener los niveles de auxinas en el nicho de células madre al evitar su salida de esta región (donde se sintetizan). Esto abre la posibilidad de que aquellos factores de crecimiento adversos pueden ser amortiguados al inducir la homeostasis en dicha región, por lo que queda como perspectiva principal demostrar dicha posibilidad.

REFERENCIAS

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walker, P., (2008). Mechanisms of cell communication in “Molecular Biology of the Cell” 5th edition. San Francisco CA Garland Science.
2. Antonious, G. F., (2018). Capsaicinoids and vitamins in hot pepper and their role in disease therapy. *IntechOpen*(2), 13-40.
3. Arce-Rodríguez, M.G., Ochoa-Alejo, N., (2019). Biochemistry and molecular biology of capsaicinoid biosynthesis: recent advances and perspectives, *Plant Cell Reports* 38: 1017-1030.
4. Arin, L., & Arabaci, C., (2019). The influence of exogenous capsaicin application on the germination, seedling growth, and yield of pepper. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 43: 500-507.
5. Armenta-Medina, A., Gillmor, C. S., Gao, P., Mora-Macias, J., Kochian, L. V., Xiang, D., Datla, R., (2021). Developmental and genomic architecture of plant embryogenesis: from model plant to crops. *Plant Communications* 2(1): 100136.
6. Barchenger, D., Bosland, P., (2016). Exogenous applications of capsaicin inhibits seed germination of *Capsicum annuum*. *Scientia Horticulturae* 203:29-31.
7. Bargmann, B., Vanneste, S., Krouk, G., Nawy, T., (2013). A map cell type-specific response. *Molecular Systems Biology* 9(1):688.
8. Benková, E., (2016). Plant hormones in interactions with the environment. *Plant Molecular Biology* 91:597-597.
9. Brumos, J., Robles, L. M., Yun, J., Vu, T. C., Jackson, S., Alonso J, M., Stepanova, A. N., (2018). Local Auxin Biosynthesis Is a Key Regulator of Plant Development. *Developmental Cell* 47: 306-318.
10. Campbell, N., Reece, J., (2005). *Biology* 7^o edition. Pearson education.
11. Cao, X., Yang, H., Shang, C., Ma, S., Liu, L., Cheng, J., (2019). Ther Roles of Auxin Biosynthesis YUCCA Gene Family in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 6343.

12. Castillo, E., Torres-Gavilán, A., Severiano, A., López-Munguía, A., Lipase-Catalyzed synthesis of pungent capsaicin analogues, *Food Chemistry* 100 (2007) 1202-1208
13. Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389, 816-824.
14. Chapa-Oliver, A. M., & Mejía-Teniente, L. (2016). Capsaicin: From Plants to a Cancer Suppressing Agent. *Molecules*, 21(931) 1-14.
15. Chen, K., Feng, L., Feng, S., Yan, Y., Ge, Z., Li, Z., Chen, Z., Multiple structure-pungency correlations of capsaicinoids, *Food Chemistry* 283 (2019) 611-620.
16. Clark, R., Lee, S.H., Anticancer Properties of capsaicin against human cancer, *Anticancer Research* 36 (2016) 837-843.
17. Costa, J., Sepulveda, M., Gallardo, V., Cayún, Y., Santander, C., Ruíz, A., Reyes, M., Santos, C., Cornejo, P., Lima, N., Santos, C., (2022). Antifungal Potential of Capsaicinoids and Capsinoids from the *Capsicum* Genus for the Safeguarding of Agrifood Production: Advantages and Limitations for Environmental Health. *Microorganisms* 10 (12): 2387.
18. Estrada, B., A., B. M., José, D., Pomar, F., & Merino, F. (2002). Capsaicinoids in vegetative organs of *capsicum annum* L. in relation to fruiting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (5), 1188-1191.
19. Facchini P.J. 2001. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual review of plant biology* 52:29–66.
20. Fan, Y., Lu, Y.-m., Bin, Y., Tan, C.-p., & Cui, B. (2017). Extraction and purification of capsaicin from *capsicum oleoresin* using an aqueous two-phase system combined with chromatography. *Journal of Chromatography B*, 11-17.
21. Fernández-Barbosa, R. J., & Suárez-Meza, C. L. (2009). Antagonism in vitro of *Trichoderma harzianum* Rifai against *Fusarium oxysporum* Scheelecht f.sp *passiflorae*

- in passion fruit (*Passiflora adulis* Sims var. *Flavicarpa*) from colombian bananera zone municipality. *Journal of the National Faculty of Agronomy Medellín*, 4743-4748.
22. Fukui, K., Arai, K., Tanaka, Y., Aoi, Y., Jez, J. M., Kubes, M. F., Napier, R., Zhao, Y., Kasahara, H., Hayahi K. I., (2022). Chemical inhibition of the auxin inactivation pathway uncovers the roles of metabolic turnover in auxin homeostasis. *PNAS* 119: 32.
 23. Goldberg, R., de Paiva, G., Yadegari, R., (1994). Plant Embryogenesis: Zygote to Seed. *Science* 266: 605-614.
 24. Gull, A., Ahmad-Lone, A., UI Islam, N., (2019). Biotic and abiotic stresses in plans. *IntechOpen*. 66714.
 25. Haak, D. C., McGinnis, L. A., Levey, D. J., & Tewksbury, J. J. (2012). Why are not all chilies hot? A trade-off limits pungency . *Proceedings of Royal Society*, 2012-2017.
 26. Han, C., Yang, P., (2015). Studies on the molecular mechanisms of seed germination. *Proteomics* 15 (10): 1671-1679).
 27. Han, J. W., Shim, S. H., Jang, K. S., Choi, Y. H., Kim, H., Choi, GJ., (2018) In vivo disease control efficacy of isoquinoline alkaloids isolated from *Corydalis ternate* against wheat leaf rust and pepper anthracnose. *J Microbiol Biotechnol* 28: 262-266.
 28. Hardtke, C. S., Berleth, T., (1998). The Arabidopsis gene MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *The EMBO Journal* 17 (5):1405-1411).
 29. Hayashi, K.I., Arai, K., Aoi, Y., Tanaka, Y., Hira, H., Guo, R., Hu, Y., Ge, C., Zhao, Y., Kasahara, H., Fukui, K., (2021). The main oxidative inactivation pathway of the plant hormone auxin. *Nature Communication* 12 (6752).
 30. He, M., He, C. Q., Ding, N. Z., (2018). Abiotic Stresses: General Defenses of Land Plants and Chances for Enfinnering Multistress Tolerance. *Frontiers in Plant Science* 9:1771

31. He, W., Brumos, J., Li, H., Ji, Y., Ke, M., Gong, X., Zeng, Q., Li, W., Zhang, X., An, F., Wen, X., Li, P., Chu, J., Sun, X., Yan, C., Yan, N., Xie, D. Y., Raikhel, N., Yang, Z., Stepanova, A. N., Alonso, J. M., Guo, H., (2011). A Small-Molecule Screen Identifies L-Kynurenine as a Competitive Inhibitor of TAA1/TAR Activity in Ethylene-Directed Auxin Biosynthesis and Root Growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 23: 3944-3960.
32. Hetherington, A. J., Dolan, L., (2019). Rhynie chert fossils demonstrate the independent origin and gradual evolution of lycophyte roots. *Curr. Opin. Plant Biol.* 47:119–26.
33. Hopkins, W. & Huner, N., (2008). *Introduction to Plant Physiology 4^o*. Wiley.
34. Hughes, T. D., Guner, O. F., Iradukunda, E. C., Phillips, R. S., Bowen, J. P., (2022). The Kynurenine Pathway and Kynurenine 3-Monooxygenase Inhibitors. *Molecules* 27: 273.
35. Hui, D., (2012). Food Web: Concept and Applications. *Nature Education Knowledge* 3 (12): 6.
36. Imran, Q. M., Falak, N., Hussain, Adil., Mun, B. G., Yun, B. W., (2021). Abiotic Stress in Plants; Stress Perception to Molecular Response and Role of Biotechnological Tools in Stress Resistance. *Agronomi* 11 (8) : 1579.
37. Iqbal, Z., Iqbal, M. S., Hashem, A., Abd-Allah, E. F., Ansari, M. I., (2021). Plant Defense Responses to Biotic Stress and Its Interplay With Fluctuating Dark/Light Conditions. *Frontiers in Plant Science* 12: 631810.
38. Kramer, U., (2015). The Natural History of Model Organisms: Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *Ecology, Plant Biology* 4:e06100.
39. Kebrom, T.H., (2017). A Growing Stem Inhibits Bud Outgrowth- The Overlooked Theory of Apical Dominance. *Frontiers in Plant Science* 8: 1874.
40. Kettles, G. J., & Luna, E. (2019). Food security in 2044: How do we control the fungal threat? *Fungal Biology*, 123, 558-564.
41. Kriechbaumer, V., Botchway, S. W., Hawes, C., (2016). Localization and interaction between *Arabidopsis* auxin biosynthetic enzymes in the TAA/YUC-dependent pathway. *Journal of Experimental Botany* 67 (14): 4195-4207.

42. Köhl, J., Kolnaar, R., Ravensberg, W.J., Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy, *Frontiers in Plant Science* 10 (2019) 845.
43. Krecek, P., Skupa, P., Libus, J., Naramoto, S., Tejos, R., Friml, J., Zazimalová, E., (2009). The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biology* 10: 249.
44. Lavenus, J., Goh, T., Roberts, I., Guyomarc'h, S., Lucas, M., De Smet, I., Fukaki, H., Beeckman, T., Bennett, M., Laplaze, L., (2013). Lateral root development in *Arabidopsis*: fifty shades of auxin. *Trends in Plant Science* 28: 450-458.
45. Lee, Y., Sung-Lee, W., Soo-Hwan, K., (2012). Hormonal regulation of stem cell maintenance in roots. *Journal of Experimental Botany* 64 (5): 1153-1165.
46. Leyser, O., (2005). Auxin Distribution and Plant Pattern Formation: How Many Angels Can Dance on the Point of PIN?. *Cell* 121: 819-822.
47. Taiz, L. & Zeiger, E., (2006). *Fisiología Vegetal* 3^o edición. Universitat Jaume
48. Lu, Y. & Cui, B., Extraction and purification of capsaicin from capsicum oleoresin using a combination of tunable aqueous polymer-phase impregnated resin (TAPPIR) extraction and chromatography technology. *Molecules* 24 (2019) 3956.
49. Malamy, J. E. & Benfey, P. N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124 (1): 33-34.
50. Mashiguchi, K., Tanaka, K., Sakai, T., Kasahara, H., (2011). The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*.
51. Michniewicz, M., Brewer, P.B., Friml, J., (2007). Polar Auxin Transport and Asymmetric Auxin Distribution. *The Arabidopsis Book*: 1-28.
52. Miransari, M & Smith D.L., (2014). Plant hormones and germination, *Environmental and Experimental Botany* 99: 110-121. *PNAS* 108 (45): 18512-18517.
53. Mosa, K. A., Ismail, A., Helmy, M., (2017). *Plant Stress Tolerance*: 1-19.
54. Motte, H., Vanneste, S., Beeckman, T., (2019). Molecular and environmental regulation of root development. *Annual Review of Plant Biology* 70:22.1-22.24.

55. Motte, H., Beeckman, T., (2019). The evolution of root branching: increasing the level of plasticity. *J. Exp. Bot.* 70:785–93.
56. Nishimura, T, Hayashi, K., Suzuki, H., Gyohda, A., Takaoka, C., Sakaguchi, Y., Matsumoto, S., Kasahara, H., Sakai, T., Kato, J., Kamiya, Y., Koshiba, T., (2014). Yucasin is a potent inhibitor of YUCCA, a key enzyme in auxin biosynthesis. *The plant journal* 77: 352-366.
57. Niu, Y., Jin, G., Li, X., Tang, C., Zhang, Y., Liang, Y., Yu, J., (2015). Phosphorus and magnesium interactively modulate the elongation and directional growth of primary roots in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Journal of Experimental Botany*: 1-14.
58. Pang, Z., Chen, J., Wang, T., Gao, C., Li, Z., Guo, L., Xu, J., Cheng, Y., (2021). Linking Plant Secondary Metabolites and Plant Microbiomes: A Review. *Frontiers in Plant Science* 12: 621276.
59. Péret, B., Swarup, K., Ferguson, A., Seth, M., Yang, Y., Dhondt, S., James, N., Casimiro, I., Perry, P., Syed, A., Yang, H., Remmer, J., Vernison, E., Murphy, A., Bennett, M. J., Nielsen, E., Swarup, R., (2012). AUX/LAX Genes Encode a Family of Auxin Influx Transporters That Perform Distinct Functions during *Arabidopsis* Development. *The Plant Cell* 24: 2874-2885.
60. Perilli, S., Moubayidin, L., Sabatini, S., (2010). The molecular basis of cytokinin function. *Current Opinion in Plant Biology* 13:21-26.
61. Phillips, R. S., Iradukunda, E. C., Hughes, T., Bowen J. P., (2019). Modulation of Enzyme Activity in the Kynurenine Pathway by Kynurenine Monooxygenase Inhibition. *Frontiers in Molecular Biosciences* 6: 3
62. Reyes-Escogido, M. d., Gonzales-Mondragon, E. G., & Vazquez-Tzompantzi, E. (2011). Chemical and pharmacological aspects of capsaicin. *Molecules*, 1253-1270.
63. Rezendes-Naves, E., Silva, L. d., Sulpice, R., Araújo, W. L., Nunes-Nesi, A., Peres, L. E., y otros. (2019). Capsaicinoids: Pungency beyond Capsicum. *Trends in Plant Science*, 109-120.

64. Rosquete, M. R., Barbez, E., Vehn J. K., (2012). Cellular Auxin Homeostasis: Gatekeeping Is Housekeeping. *Molecular Plant* 5 (4): 772-786.
65. Ryan, P. R., Delhaize, E., Watt, M., Richardson, A. E., (2016). Plant roots: understanding structure and function in an ocean of complexity. *Annals of Botany* 118: 555-559.
66. Sepulveda-Jiménez, G., Porta-Ducoing, H., & Rocha-Sosa, M. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 355-363.
67. Sharma, S. K., Vij, A.S., Sharma, M., Mechanisms and clinical uses of capsaicin, *European Journal of Pharmacology* 720 (2013) 55-62.
68. Sierra-Sarmiento, M. A., Barros-Algarra, R., Gómez- Paternina, D., Mejía-Terán, A., & Suarez-Rivero, D. (2018). *Productos Naturales: Metabolitos secundarios y aceites esenciales*. Fundacion Universitaria Agraria de Colombia.
69. Soares-Brauer, V., Patini-Rezende, C., Moreira-Pessoni, A., Graciano de Paula, R., Rangappa, K.S., Chandra-Nayaka, S., Kumar-Gupta, V., Almeida, F., Antifungal agents in agriculture: Friends and foes of public health, *Biomolecules* 9 (2019) 521.
70. Spiller, F., Alves, M. K., Vieira, S. M., Carvalho, T. A., Leite, C. E., Lunardelli, A., y otros. (2007). Anti-inflammatory effects of red pepper (*Capsicum baccatum*) on carrageenan and antigen-induced inflammation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 473-476.
71. Su, Y. H., Liu, Y. B., Zhang, X. S., (2011). Auxin-Cytokinin Interaction Regulates Meristem Development. *Molecular Plant* 4 (4): 616-625.
72. , P. & Vidyasagar, G. M. ,(2016). Phytochemical screening for secondary metabolites of *Opuntia dillenii*. *Journal of Medicinal Plants Studies* 4 (5): 39-43.
73. Swarup, R., Bhosale, R., (2019). Developmental Roles of AUX/LAX Auxin Influx Carriers in Plants. *Frontiers in Plant Science* 10: 1306.

74. Ung, K. L., Winkler, M., Schulz, L., Kolb, M., Janacek, D. P., Dedic, E., Stokes, D. L., Hammes, U. Z., Pedersen, B. P., (2022). Structures and mechanism of the plant PIN-FORMED auxin transporter. *Nature* 609: 605-610.
75. van den Berg C, Willemsen V, Hendriks G, Weisbeek P, Scheres B (1997). Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* 390:287–89
76. Varghese, S., Kubatka, P., Gazdikova, K., Caprnda, M., Fedetova, J., Zulli, A., y otros. (2016). Chilli pepper as a body weight-loss food. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 1465-3478.
77. Vázquez-Flota, F., Miranda-Ham, M. d., Moforte-González, M., Gutiérrez-Carbajal, G., Velázquez-García, C., & Pelayo-Nieto, Y. (2007). LA BIOSÍNTESIS DE CAPSAICINOIDES, EL PRINCIPIO PICANTE DEL CHILE. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(4), 353-360.
78. Vázquez-Fuentes, S., Pelagio-Flores, R., López-Bucio, J., Torres-Gavilán, A., Campos-García, J., Reyes de la Cruz, H., López-Bucio, J. S., (2021). N-vanillyloctanamide represses growth of fungal phytopathogens in vitro and confers postharvest protection in tomato and avocado fruits against fungal-induced decay. *Protoplasma* 258:729-741.
79. Verma, V., Ravindran, P., Kumar, P. P., (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biology* 16: 86.
80. Vissenberg, K., Claeijs, N., Balcerowicz, D., Schoenaers, S., (2020). Hormonal regulation of root hair growth and responses to the environment in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*. 71: 2412-2427.
81. Vu, L. D. & De Smet, I., (2016). Cellular Dynamics of Primary Shoot and Root Meristem. *Molecular Cell Biology of the Growth and Differentiation of Plant Cells* 199-219.

82. Wahyuni, Y., Ballester, A. R., Sudarmonowati, E., Bino, R. J., Bovy, A., (2013). Secondary metabolites of Capsicum species and their importance in the human diet. *J. Nat. Prod.* 76, 783–793
83. Wang, K., Chen, H., Ortega-Perez, M., Miao, Y., Ma, Y., Henschen, A., Lohmann, J. U., Laubinger, S., Bayer, M., (2021). Independent parental contribution initiates zygote polarization in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* 31 (21): 4810-4816.
84. Weitbrecht, K., Muller, K., Leubner-Metzger, G., (2011). First off the mark: early seed germination. *Journal of Experimental Botany* 62 (10): 3289-3309.
85. Xing, F., Cheng, G., Yi, K., Study on the antimicrobial activities of the capsaicin microcapsules, *Journal of Applied Polymer Science* 102 (2006) 1318-1321.
86. Yang, F., Xiao, X., Cheng, W., Yang, W., Yu, P., Song, Z., . . . Zheng, J. (2015). Structural mechanism underlying capsaicin binding and activation of TRPV1 ion channel. *Nat Chem Biol*, 11(7).
87. Yang, K., Wang, L., Le, J., Dong, J., (2020). Cell polarity: Regulators and mechanisms in plants. *Journal of Investigative Plant Biology*, 62 (1): 132-147.
88. Yan, R., Zhao, L., Tao, J., Zou, Y., Xu, X., Preparative isolation and purification of capsaicin and dihydrocapsaicin from Capsici fructus using supercritical fluid extraction combined with high speed countercurrent chromatography, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 98: (2018) 2498-2506
89. Zadnikova, P., Smet, D., Zhu Q., Van Der Straeten, D., Benkova, Eva., (2015). Strategies of seedlings to overcome their sessile nature: auxin in mobility control. *Frontiers in Plant Science* 6 (218).
90. Zazimalová, E., Murphy A. S., Yang, H., Hoyerová, K., Hosek, P., (2010). Auxin Transporters- Why So Many?. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2(3): a001552.
91. Zhang Q., Gong M., Xu X., Li H., Deng, W., (2022). Roles of Auxin in the Growth Development, and Stress Tolerance of Horticultural Plants. *Cells* 11(17), 2761
92. Zhu, Y., Li, H. J., Su, Q., Wen, J., Wang, Y., Song, W., Xie, Y., He, W., Yang, Z., Jiang, K., Guo, H., (2019). A phenotype-directed chemical screen identifies ponalrestant as an inhibitor of the plant flavin monooxygenase YUCCA in auxin biosynthesis. *J. Biol. Chem* 294 (52): 19923-19933.

