



# UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

## INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

Regulación del desarrollo post-embrionario de la raíz de  
*Arabidopsis thaliana* por *N*-acil-L-homoserina lactonas, una  
clase de compuestos moduladores de la proliferación celular  
en bacterias.

Tesis que presenta

**RANDY ORTIZ CASTRO**

para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

en

**Biología Experimental**

**Director de tesis**

**D. en C. José López Bucio**

**Co-director de tesis**

**D. en C. Miguel Martínez Trujillo**

**Sinodales**

**D. en C. Jesús Campos García**

**D. en C. Eduardo Valencia Cantero**

**Morelia, Michoacán, México.**

**Noviembre de 2008**

*La oscuridad es efectivamente penosa para la mente, como lo es para el ojo, pero sacar la luz de la oscuridad, por el esfuerzo que sea, ha de ser deleitable y producir regocijo.*

David Hume

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección del D. en C. José López Bucio y co-dirección del D. en C. Miguel Martínez Trujillo.

# AGRADECIMIENTOS

**A mis padres**, Alfonso Ortiz y Petra Castro, les agradezco su apoyo y enseñanzas en la carrera de la vida y sus grandes consejos, los amo mucho.

**A mis hermanos**, Luis Euri y Marisela, así es los quiero mucho y saben que significan mucho para mí, siempre son mi gran inspiración.

**Al D. en C. José López Bucio**, por su apoyo y asesoría en esta carrera de la investigación y brindarme la oportunidad de compartir sus conocimientos, además de sus grandes consejos.

**Al D. en C. Miguel Martínez Trujillo**, una gran persona y grandes consejos de aliento y sobre todo por apoyarme en los momentos difíciles de ese camino lleno de obstáculos. Gracias por todo.

**Al D. en C. Jesús Campos**, por su apoyo y consejos en la realización de la tesis, también al **D. en C. Eduardo Valencia**, por sus opiniones que ayudaron a enriquecer y mejorar este trabajo.

**A mis compañeros de la generación 2006-2008**, Cinthia, Sacnite, Viridiana, Mónica, Mauricio, Edgar, José Luis, Luis María, gracias a todos por permitirme conocerles y compartir momentos alegres.

**A mis compañeros del Laboratorio**, Alina, Alfonso, Ramón, Javier, Hexon, Ariana, Mayra, Enrique. Gracias por su apoyo y esos ratos que pasamos y aun más por aguantarme y su apoyo.

**Y un especial agradecimiento**, por lo todo lo que me ha brindado y apoyado siempre. Su alegría y momentos tan divertidos que pasamos y el tiempo que ha aguantado por estar ahí a mi lado. Besos princesa te amo Cecy.

## INDICE

RESUMEN.	1
1. INTRODUCCIÓN.	3
2. ANTECEDENTES.	5
2.1. La raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	5
2.2. Raíces laterales.	7
2.3. Pelos radiculares.	9
2.4. Factores que modulan el desarrollo de la raíz.	10
2.4.1. Auxinas.	11
2.5. Nuevas moléculas señal.	12
2.5.1. Glutamato.	12
2.5.2. Óxido nítrico.	14
2.5.3. <i>N</i> -acil etanolamidas.	15
2.5.4. Alcamidas.	17
2.6. Interacciones planta-microorganismo.	18
2.7. El quorum-sensing y la comunicación celular en las bacterias.	20
2.8. Señalización por <i>N</i> -acil homoserina lactonas.	21
2.9. Participación de las <i>N</i> -acil homoserina lactonas en la interacción planta-bacteria.	23
3. JUSTIFICACIÓN.	26
4. HIPÓTESIS.	26
5. OBJETIVOS.	27
5.1. Objetivo general.	27
5.2. Objetivos particulares.	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS.	28
6.1. Material biológico y condiciones de crecimiento.	28
6.2. Cepas bacterianas.	28
6.3. Ensayos de inoculación bacteriana.	29
6.4. Purificación de AHLs de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 y análisis por HPLC y GC-MS.	29
6.5. Bio-ensayos con AHLs colectadas y purificadas de <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> PAO1.	30
6.6. Análisis de crecimiento vegetal.	31

6.7. Análisis histoquímico de actividad de GUS.	31
6.8. Microscopía.	32
7. RESULTADOS.	33
7.1. Efecto de las AHLs en la germinación de <i>Arabidopsis</i> .	33
7.2. Efecto de las AHLs sobre la arquitectura del sistema radicular de <i>Arabidopsis</i> .	35
7.3. Efecto de la C10-HL en el desarrollo de las raíces laterales en <i>Arabidopsis</i> .	36
7.4. Efecto de las AHLs sobre el desarrollo de los pelos radiculares.	38
7.5. La C10-HL afecta la división y diferenciación celular en raíces de <i>Arabidopsis</i> .	43
7.6. El efecto de la C10-HL sobre el desarrollo de la raíz es independiente de la señalización por auxina.	44
7.7. Efecto de la C10-HL en la formación de pelos radiculares en la mutante <i>rhd6</i> de <i>Arabidopsis</i> .	50
7.8. Participación de la amido hidrolasa de ácidos grasos de <i>Arabidopsis</i> en la respuesta de la raíz a C10-HL.	50
7.9. Estimulación del crecimiento en <i>Arabidopsis</i> por rizobacterias del género <i>Pseudomonas</i> .	52
7.10. La mutación de los genes <i>lasI</i> y <i>rhlI</i> potencia el efecto promotor del crecimiento de <i>A.thaliana</i> por <i>P. aeruginosa</i> .	54
7.11. La modulación del crecimiento de la raíz por la inoculación de <i>P. aeruginosa</i> involucra cambios en la división celular a través de un mecanismo mediada por la AHL sintasa <i>lasI</i> .	56
7.12. Identificación de la AHL producida por <i>P. aeruginosa</i> responsable de la inhibición del crecimiento de la raíz primaria en <i>Arabidopsis</i> .	59
7.13. Efecto de la N-3-OH-C8-HL aislada de <i>P. aeruginosa</i> sobre la arquitectura de la raíz de <i>Arabidopsis</i> .	61
8. DISCUSIÓN.	65
9. CONCLUSIONES.	70
10. REFERENCIAS.	71
11. APÉNDICE.	78

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de principales fitohormonas.	4
Figura 2. Sección transversal y longitudinal de la raíz de <i>Arabidopsis</i> .	6
Figura 3. Etapas de desarrollo durante la formación de raíces laterales en <i>Arabidopsis</i> .	8
Figura 4. Modelo celular del sistema de transporte polar de auxina célula-célula.	13
Figura 5. Estructura química de señales con funciones novedosas en las plantas.	14
Figura 6. Diferentes clases de autoinductores.	21
Figura 7. Mecanismo de quorum-sensing en <i>Vibrio fischeri</i> .	22
Figura 8. Similitud estructural de C10-HL y compuestos relacionados de plantas.	25
Figura 9. Estructura química de las <i>N</i> -acil homoserina lactonas usadas en este estudio.	34
Figura 10. Efecto de las AHLs en la germinación de <i>Arabidopsis</i> .	35
Figura 11. Efecto de las AHLs sobre en el desarrollo de la raíz de <i>Arabidopsis</i> .	37
Figura 12. Efecto de las AHLs en el desarrollo de raíces laterales de <i>Arabidopsis</i> .	39
Figura 13. Efecto de las AHLs en el desarrollo de los pelos radiculares.	41
Figura 14. Efecto de la C10-HL sobre la diferenciación de células epidérmicas..	42
Figura 15. Efecto de la C10-HL sobre la expresión de marcadores de división y diferenciación celular.	44
Figura 16. Efecto de la C10-HL sobre la longitud del meristemo.	45
Figura 17. Efecto de la C10-HL sobre la expresión de genes regulados por auxinas.	46
Figura 18. Efecto de la AIA en el crecimiento de la raíz primaria de plantas silvestres de <i>Arabidopsis</i> (Col-0) y mutantes insensibles a auxinas.	47

Figura 19. Morfología de los ápices de la raíz de plantas silvestres de <i>Arabidopsis</i> (Col-0) y de las mutantes <i>aux1-7</i> y <i>axr2</i> insensibles a auxinas tratadas con concentraciones crecientes de AIA.	48
Figura 20. Efectos de la C10-HL en el crecimiento de la raíz primaria y formación de raíces laterales en mutantes insensibles a auxinas.	49
Figura 21. Efecto del AIA y C10-HL en la formación de pelos radiculares en la mutante <i>rhd6</i> de <i>Arabidopsis</i> .	51
Figura 22. Efecto de la C10-HL sobre el crecimiento de líneas mutantes y sobreexpresantes de la amido hidrolasa de ácidos grasos de <i>Arabidopsis</i> .	53
Figura 23. Estimulación del crecimiento de plantas de <i>Arabidopsis</i> por bacterias del género <i>Pseudomonas</i> .	54
Figura 24. Efecto de la inoculación con bacterias del género <i>Pseudomonas</i> en la arquitectura del sistema radicular de <i>Arabidopsis</i> .	55
Figura 25. Efecto de la inoculación con <i>P. aeruginosa</i> PAO1 y mutantes en las AHLs sintasas sobre el crecimiento de la raíz primaria en plantas de <i>Arabidopsis</i> .	57
Figura 26. Estimulación del crecimiento de <i>Arabidopsis</i> por la mutación de las sintasas <i>LasI</i> y <i>RhlI</i> de <i>P. aeruginosa</i> .	58
Figura 27. Modulación en la expresión de genes de división celular en <i>Arabidopsis</i> por la inoculación de <i>P. aeruginosa</i> .	60
Figura 28. Identificación de componentes del extracto de <i>P. aeruginosa</i> con actividad inhibitoria sobre el crecimiento de la raíz primaria de <i>Arabidopsis</i> .	62
Figura 29. Identificación química del compuesto de <i>P. aeruginosa</i> inhibe el crecimiento de la raíz de <i>Arabidopsis</i> .	63
Figura 30. Efecto de la 3-OH-C8-HL sobre la morfología de la raíz de <i>Arabidopsis</i> .	64

## RESUMEN.

Las plantas para modular su crecimiento y desarrollo dependen de diferentes tipos de sustancias conocidas comúnmente como reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas, entre los que destacan las auxinas, las citocininas, el etileno, las giberelinas y el ácido abscísico. Recientemente ha sido descrita una clase novedosa de compuestos lipídicos que incluye a las alcanidas y las *N*-aciletanolamidas. Estos compuestos pueden ser acumulados en los diferentes tejidos de la planta o secretados por la raíz modificando las características de su entorno rizosférico. En las bacterias, también se han encontrado moléculas de estructura química similar a las alcanidas, las *N*-acil homoserina lactonas, que regulan diferentes procesos celulares dependientes de su densidad poblacional, mediante el mecanismo de señalización conocido como quorum-sensing.

Aunque las *N*-acil homoserina lactonas (AHLs) se han estudiado con gran detalle por su importancia en la comunicación célula-célula entre las bacterias Gram negativas, poco se conoce acerca de la respuesta de las plantas a estos compuestos. En este trabajo se caracterizaron los efectos de diferentes AHLs sobre el desarrollo post-embriionario de la raíz de *Arabidopsis thaliana* para determinar su actividad en las plantas. Se observaron diferentes efectos de las AHLs dependiendo de la longitud de su cadena de ácido graso, incluyendo la inhibición en el crecimiento de la raíz primaria y la estimulación en la formación de raíces laterales y pelos radiculares. Las AHLs con longitud de cadena de ácido graso de 8 a 12 carbonos fueron las que mostraron una mayor actividad biológica y en particular, la *N*-decanoil-HL fue el compuesto con efectos más notorios sobre el desarrollo de la raíz. Para evaluar los efectos de la *N*-decanoil-HL sobre los procesos de división celular y diferenciación se analizaron los cambios en la expresión de los marcadores del ciclo celular *CyCB1:uidA* y *PRZ1:uidA* y de diferenciación *AtEXP7:uidA*. Nuestros resultados indican que concentraciones micromolares de AHLs afectan la proliferación celular en el meristemo de la raíz primaria, inhibiendo el ciclo celular durante la fase G2-M. Aunque los efectos de la

*N*-decanoil-HL son muy similares a los producidos por las auxinas en la modulación de la arquitectura del sistema radicular, las respuestas de la raíz primaria y de las raíces laterales a este compuesto resultaron independientes de la ruta de señalización de auxinas.

Se ha descrito que tanto las alcanidas como las AHLs pueden metabolizarse mediante la acción de enzimas hidrolíticas que separan el grupo amido de la cadena de ácido graso. Estas enzimas son ubicuas en las bacterias y en las plantas. Recientemente se descubrió una enzima de *Arabidopsis thaliana* con actividad de amido hidrolasa (AtFAAH), lo que permitió aislar mutantes afectadas en esta enzima y producir plantas transgénicas que sobreexpresan el gen correspondiente. Para estudiar una posible participación de esta enzima en el metabolismo de AHLs, se evaluó la respuesta morfogénica de líneas mutantes y sobreexpresantes de la AtFAAH a tratamientos con *N*-decanoil-HL considerando como marcadores biológicos, la producción de biomasa y la arquitectura de la raíz. Las mutantes y las líneas transgénicas mostraron efectos diferenciales para los dos marcadores, indicando que la amido hidrolasa de *Arabidopsis* es capaz de hidrolizar AHLs de origen bacteriano.

Los resultados farmacológicos y la alteración de los niveles de expresión de la amido hidrolasa sugieren que las AHLs pueden afectar la morfogénesis vegetal. Esto abre la posibilidad de que algunas bacterias Gram negativas promuevan el crecimiento de las plantas a través de la producción de AHLs. Para probar esta hipótesis se evaluó el efecto de la inoculación de plantas de *A. thaliana* con bacterias del género *Pseudomonas*. La inoculación con *P. aeruginosa*, *P. putida* y *P. fluorescens* estimuló la producción de biomasa y promovió la ramificación de la raíz en un mecanismo dependiente de la sintasa de AHLs *lasI* de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que las AHLs regulan el desarrollo en *Arabidopsis* y que las plantas poseen la maquinaria enzimática para metabolizar estos compuestos, lo cual revela un nuevo modo de comunicación en la interacción planta-bacteria basada en la producción de lípidos aminados.

## 1. INTRODUCCIÓN.

El sistema radicular de las plantas desempeña funciones adaptativas esenciales incluyendo la captación de agua y nutrientes, el anclaje al suelo y el establecimiento de interacciones bióticas y abióticas en la rizósfera. Tres procesos afectan la arquitectura del sistema radicular. Primero, la división celular en el meristemo de la raíz primaria otorga la capacidad de un crecimiento indeterminado por la incorporación de nuevas células a la raíz. Segundo, la formación de raíces laterales incrementa la capacidad exploratoria del sistema radicular; y tercero, la formación de pelos radiculares incrementa la superficie total de adsorción de la raíz primaria y laterales (Dolan *et al.*, 1993). La alteración en alguno de estos procesos puede afectar la configuración del sistema radicular y modificar la capacidad de las plantas para crecer en suelos en los cuáles la disponibilidad de nutrientes es limitada (López-Bucio *et al.*, 2003, Malamy & Benfey, 1997; Casimiro *et al.*, 2003; Dubrovsky *et al.*, 2006).

El crecimiento y desarrollo de las plantas involucra la integración de diversas señales endógenas y ambientales que, junto con el programa genético intrínseco, determinan la forma y funcionamiento de los diferentes tejidos incluyendo la raíz. Las plantas cuentan con un sistema sofisticado para integrar información del ambiente y para responder activamente a los estímulos bióticos y abióticos, de igual manera, poseen mecanismos para la comunicación entre los diferentes órganos y tejidos. Virtualmente cada aspecto del desarrollo de la planta desde la embriogénesis hasta la senescencia esta sujeto a una regulación química mediada por diferentes sustancias conocidas como fitohormonas. Una hormona puede regular un conjunto amplio de procesos celulares y morfogénicos, mientras que al mismo tiempo múltiples hormonas pueden influir en un mismo proceso (Gray, 2004; Suárez-López, 2005). En general, este control del desarrollo ocurre por alteraciones en la división celular, la expansión, la diferenciación y la muerte celular que afectan procesos como la germinación, la determinación de la arquitectura de la planta, la floración, la fructificación y la senescencia (Bishopp *et al.*, 2006).

Las fitohormonas más estudiadas son las auxinas, las citocininas, las giberelinas, el ácido abscísico, el ácido jasmónico, el etileno y más recientemente los brasinosteroides (Fig. 1), generalmente son moléculas orgánicas pequeñas las cuales actúan a bajas concentraciones. Estas se sintetizan en los diferentes tejidos de la planta y pueden transportarse a otros tejidos a través del sistema vascular, como el caso de las auxinas o difundirse libremente a través de las membranas como el etileno (Gray, 2004).

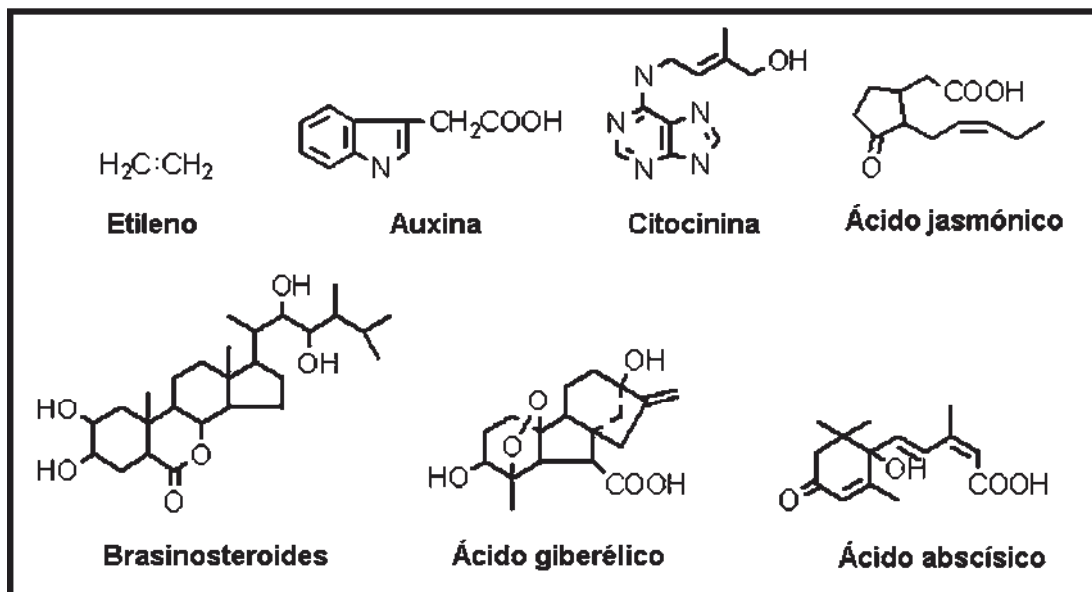


Figura 1. Estructura química de principales fitohormonas. Tomado de Gray, 2004.

Recientemente se han reportado moléculas señal con funciones novedosas en las plantas, algunas de los cuales se habían descrito con anterioridad en sistemas animales incluyendo al óxido nítrico y al glutamato. De interés particular para nuestro trabajo es la identificación de una nueva clase de lípidos presentes en las plantas que incluye a las *N*-aciletanolamidas y las alcanidas, que en los mamíferos modulan diferentes procesos celulares mediante su unión a receptores de cannabinoides (Morquecho-Contreras & López-Bucio, 2007). La búsqueda de compuestos relacionados estructuralmente con las alcanidas en las bacterias, condujo a la identificación de las *N*-acil homoserina lactonas que participan en la comunicación celular y cuyo estudio constituye la base del presente trabajo.

## 2. ANTECEDENTES.

### 2.1. La raíz de *Arabidopsis thaliana*.

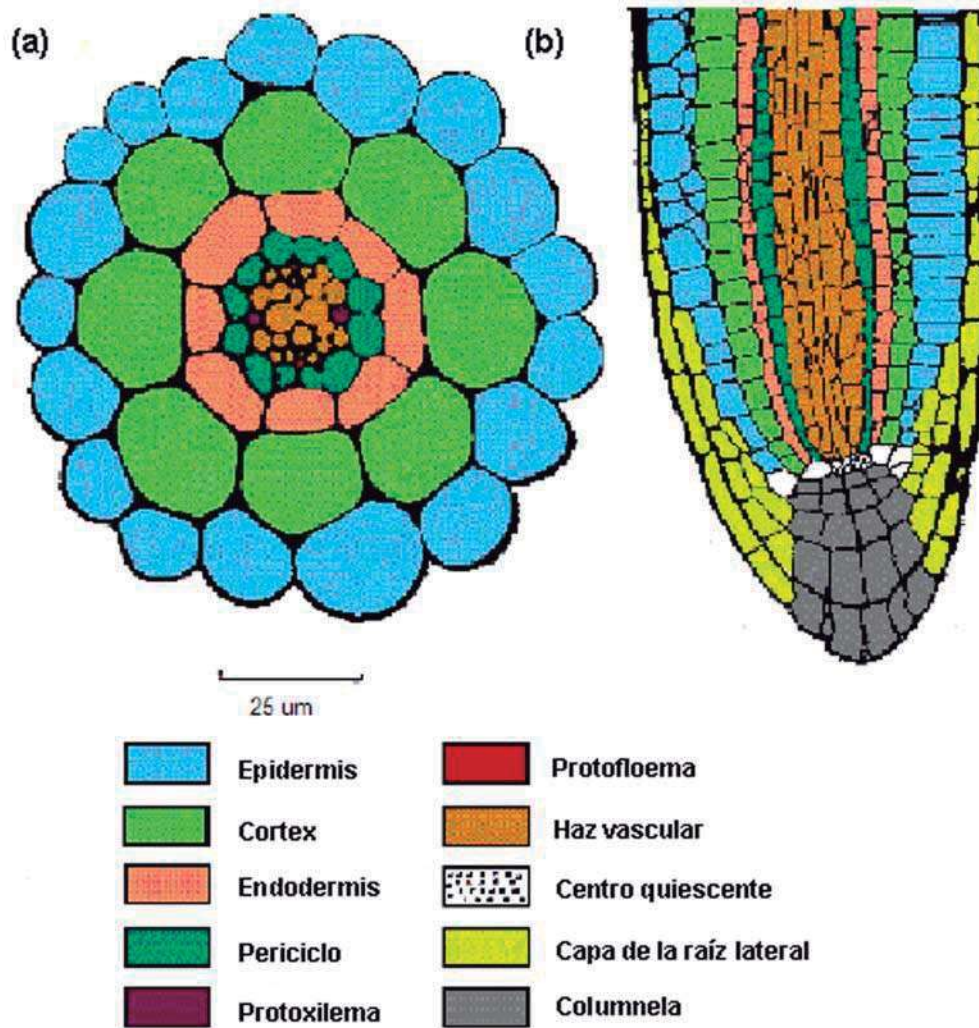
Desde una perspectiva del desarrollo, la raíz de *Arabidopsis* representa un modelo de simplicidad. Un número pequeño de células madre generan todos los tipos celulares a través de divisiones estereotípicas seguidas de una diferenciación y expansión celular. Debido a que el crecimiento de la raíz es indeterminado, estos procesos son continuos, presentando todos los estados de desarrollo al mismo tiempo.

Las células que forman los diferentes tejidos se producen a partir de cuatro células madres (células iniciales) localizadas en el ápice de la raíz (Dolan *et al.*, 1993). Internamente y en contacto con las células iniciales se encuentra un número pequeño de células que son mitóticamente inactivas, conocidas como centro quiescente (QC, quiescent center) (Fig. 2).

En *Arabidopsis*, los linajes celulares son fácilmente reconocidos como columnas (o filas) de células organizadas a lo largo de la longitud radicular, las cuales se generan a través de divisiones transversales repetidas en la región meristemática. De esta forma, las filas celulares se asemejan a una “línea de ensamblaje celular”, con cada célula en una fila más avanzada en desarrollo que la antecesora desde el ápice (Schiefelbein *et al.*, 1997). Otro rasgo importante para estudios citológicos es el patrón radial de la raíz, el cual está conformado por anillos (o capas) concéntricos de tejidos, dicha anatomía es relativamente simple y está compuesta de capas o anillos de células individuales que forman la epidermis, córtex, endodermis y periciclo rodeando una estela central de tejidos vasculares (Fig. 2; Dolan *et al.*, 1993; Casimiro *et al.*, 2001), con un número constante de ocho células por anillo para las capas de la corteza y la endodermis (Fig. 2a; Dolan *et al.*, 1993; Celenza *et al.*, 1995).

La orientación de la expansión celular es uno de los determinantes en la formación de tejidos y órganos (Dolan & Davies, 2004). Las células de la raíz se forman en el meristemo, en esta zona la tasa de crecimiento es nula o muy baja,

pero a medida que las células salen del meristemo aumentan su tamaño a través de toda la zona de alargamiento. Al final de la zona de alargamiento, el crecimiento disminuye y las células se diferencian hasta alcanzar su forma y función finales.



**Figura 2. Sección transversal y longitudinal de la raíz de *Arabidopsis*.** (a) Sección transversal de la raíz, etiquetada por anticuerpos de pectina, impresión inversa y coloreada en código. (b) Sección longitudinal media del ápice de la raíz.

## 2.2. Raíces laterales.

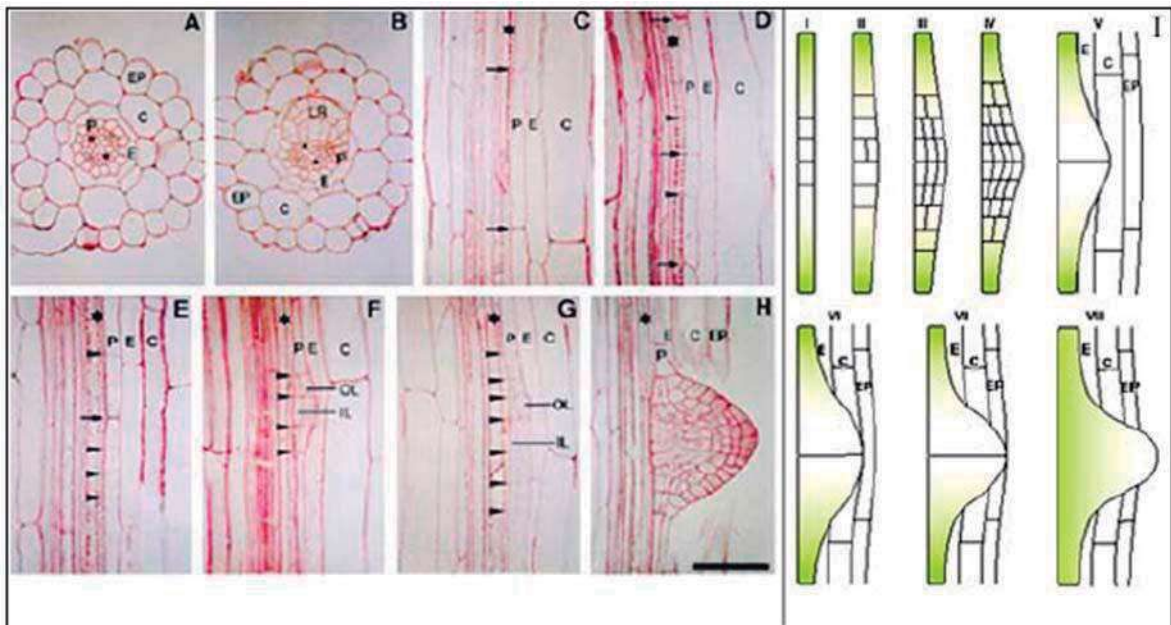
Un componente fundamental de la arquitectura de la raíz son las raíces laterales (RL), que tienen su origen a partir de células del periciclo opuestas a los polos del xilema (Dolan *et al.*, 1993).

Las células del periciclo, una vez estimuladas, se diferencian y proliferan formando un primordio de raíz lateral (PRL). La aplicación exógena de auxinas induce la iniciación de PRL y estimula el desarrollo de RL. Los patrones de desarrollo que dan origen a PRL son diferentes de los que ocurren en la formación de la raíz primaria (Casimiro *et al.*, 2001). Se ha sugerido que la formación de PRL puede ser a través de dos procesos: 1) La estimulación de la diferenciación y proliferación en la capa del periciclo que forma el PRL; 2) La formación del meristemo de la raíz lateral (Celenza *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 1995; Laskowski *et al.*, 1995). La primera división periclinal del periciclo representa el criterio utilizado más comúnmente para definir el principio de formación de raíces laterales. Se han definido siete etapas de desarrollo que preceden la emergencia de raíces laterales (Malamy & Benfey, 1997). Sin embargo, en *Arabidopsis*, la primera división periclinal ocurre dentro de grupos de células iniciales pequeñas, indicando que las células fundadoras deben sufrir también una serie de divisiones transversales (Malamy & Benfey, 1997).

El primer evento morfológico relacionado con la iniciación de RL ocurre en dos células fundadoras del periciclo dentro de la misma fila celular, adyacente a uno de los polos del xilema. Ambas células fundadoras se dividen simultáneamente creando cuatro células pequeñas. Las células hijas continúan dividiéndose simétricamente y asimétricamente, desde el centro hacia arriba y hacia abajo, creando grupos con un máximo de diez células cortas que son similares en longitud. Con frecuencia se observa considerable plasticidad en el orden preciso de estas divisiones.

Siguiendo un periodo de expansión radial, las células hijas se dividen periclinalmente, originando un primordio compuesto de capas internas y externas definido como etapa II (Malamy & Benfey 1997). La figura 3 resume las

subsecuentes divisiones dentro del primordio de la raíz lateral (denominadas etapas III-VII) que conducen por último a la emergencia (etapa VIII). El primordio de la raíz lateral sufre una expansión notable a medida que emerge desde la raíz parental (etapa VIII). Una vez emergido, el número de células cercanas al ápice de la raíz lateral se incrementa (Casimiro *et al.*, 2003).



**Figura 3. Etapas de desarrollo durante la formación de raíces laterales en *Arabidopsis*.** (A) Organización radial mostrando las capas celulares: epidermis (ep), córtex (c), endodermis (e) y periciclo (p). (B) Sección radial mostrando un primordio de raíz lateral (LR), opuesto al polo del xilema. (C) Sección longitudinal de raíz primaria, indicando las paredes celulares de una célula fundadora antes de la primera división anticlinal, iniciando la formación de un PRL (etapa 0). (D) Dos células fundadoras del periciclo han sufrido una división individual anticlinal asimétrica (etapa de primordio Ib). Las flechas indican las posiciones de las paredes celulares formadas. (E) Una célula fundadora ha sufrido tres divisiones anticlinales asimétricas, mientras que las otras han formado una división anticlinal individual (etapa Id). (F) Un primordio en etapa II que ha pasado previamente tres divisiones anticlinales asimétricas, con la capa interna (IL) y la capa externa (OL) formada. (G) Un primordio en etapa II que sufrió seis divisiones anticlinales asimétricas antes de la primera etapa II que sufrió seis divisiones anticlinales asimétricas antes de la primera división periclinal. (H) Un nuevo primordio de RL emergido. (I) Etapas de formación de raíces laterales I-VIII. La barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ . Los asteriscos en (A) y (B), indican polos xilemáticos. (Descrito en Casimiro *et al.*, 2001, 2003).

### 2.3. Pelos radiculares.

Los pelos radiculares son células epidérmicas diferenciadas que contribuyen con cerca del 77% del área superficial total de la raíz, representando el principal punto de contacto entre la planta y la rizósfera. Cada pelo radicular es una extensión de forma tubular con crecimiento apical desde la base de una célula epidérmica especializada llamada tricoblasto (Dolan *et al.*, 1994; Foreman & Dolan, 2001). Los pelos radiculares son los responsables del anclaje de la raíz y la captación de agua y nutrientes.

Mediante técnicas de microscopía con video de lapsos de tiempo, cryo-SEM y microscopía de luz se han identificado tres fases estructurales del desarrollo del pelo. El primer estado es la aparición de un bulbo en la parte basal del tricoblasto. Durante el segundo estado, se forma una estructura cilíndrica a partir del bulbo. El tercer estado, el cual comienza cuando el pelo radicular mide entre 20 a 40  $\mu\text{m}$  de longitud, involucra un incremento sostenido en la tasa de crecimiento del pelo radicular (Dolan *et al.*, 1994).

El análisis genético de las fases de formación de los pelos radiculares ha permitido identificar diversas proteínas involucradas en diferentes aspectos del desarrollo de esta estructura. Se han aislado mutantes de *Arabidopsis thaliana* incapaces de formar pelos radiculares que definen genes involucrados en los estados tempranos del crecimiento del pelo tales como *rhl1*, *rhl2* y *rhl3*. Las tres mutantes tienen fenotipos pleiotrópicos y las plantas son extremadamente enanas (Schneider *et al.*, 1997). *RHL1* codifica una pequeña proteína hidrofílica que contiene una señal de localización nuclear.

El estudio genético en el análisis del crecimiento de los pelos radiculares ha identificado cuatro grupos principales de genes. Los genes del primer grupo son requeridos para el inicio en la formación del pelo radicular, estos incluyen *RHD6*, *SHV3*, *CEN2*, *RHD3*, *SCN1* y *TIP1*. *RHD6* está involucrada en el ensamblaje de componentes celulares en el sitio de la iniciación de los pelos (Parker *et al.*, 2000). El segundo grupo de genes son requeridos para la formación del abultamiento. Solamente dos genes se encuentran en esta clase *TIP1* y *RHD1*. Se ha mostrado

que estos genes actúan en paralelo, ya la doble mutante *rhd1:tip1* no muestra el bulbo característico del tricoblasto. El tercer grupo de genes son requeridos en la transición de la formación del bulbo a un crecimiento apical. Están implicados 11 genes: *RHD2*, *SHV1*, *SHV2*, *SHV3*, *TIP1*, *BST1*, *RHD3*, *CEN1*, *CEN2*, *CEN3* y *SCN1*. Los genes del cuarto grupo son requeridos para la elongación del pelo radicular mediante un crecimiento apical. Este grupo de genes se incluyen: *TIP1*, *SCN1*, *COW1*, *RHD3*, *CEN1*, *CEN2*, *CEN3* y *BST1* (Foreman & Dolan, 2001).

Otros factores que afectan la formación de los pelos radiculares son el etileno y las auxinas. Las mutantes en las rutas de auxinas o etileno, *axr2*, *aux1* y *etr1*, muestran pelos radiculares más cortos (Pitts *et al.*, 1998, Grierson & Schiefelbein, 2002). Sin embargo, se demostró que el bloqueo de la ruta endógena de etileno no es eficiente en alterar la formación de pelos radiculares (Cho & Cosgrove, 2002), lo que suscribe los efectos de esta fitohormona en el proceso de elongación celular que determina el tamaño de estas estructuras.

#### **2.4. Factores que modulan el desarrollo de la raíz.**

Las plantas son organismos altamente sensibles que compiten constantemente por los recursos del ambiente sobre y por debajo de la superficie del suelo.

La señalización química en la planta y entre plantas es compleja, se han identificado más de 20 grupos de moléculas con función reguladora. Una gran cantidad de sustancias diferentes conocidas como metabolitos secundarios se producen en la raíz, que pueden también afectar su crecimiento y desarrollo. Esta diversidad es necesaria considerando la gran abundancia de microbios, insectos y raíces de plantas relacionadas o no relacionadas a esta zona.

Las fitohormonas son compuestos integradores de procesos morfogénicos con diferente identidad química, podemos encontrar moléculas orgánicas pequeñas como las auxinas, citocininas y giberelinas hasta gases como el etileno. A continuación se describe un grupo de las fitohormonas mejor conocidas.

### 2.4.1. Auxinas.

Las auxinas, cuyo nombre deriva de la palabra griega *auxein* que significa crecer, forma parte de uno de los principales reguladores del crecimiento. Aunque existe un gran número de auxinas entre las que se encuentran, el ácido 1-naftaleno acético (NAA), el indol-3-etanol (IET), el indol-3-acetaldehído (IAAID) y el ácido fenol acético (PAA), la principal auxina en las plantas es el ácido indol-3-acético (AIA). Por muchos años, se ha asumido que el triptófano es el precursor de AIA. Se han descrito tres rutas para biosíntesis de AIA a partir del triptófano, vía el ácido indol-3-pirúvico, la triptamina o el indol-3-acetonitrilo (Kende & Zeevaart, 1997).

El AIA actúa como una señal para los procesos de división, elongación y diferenciación celular, tanto en la embriogénesis como en procesos post-embriónicos. Durante la embriogénesis, la señalización del AIA es de gran importancia en el establecimiento de la polaridad apical-basal y en la formación de los meristemas de la raíz y del follaje (Bishopp *et al.*, 2006).

Las auxinas son de gran importancia en muchos aspectos del desarrollo de la raíz, incluyendo la formación y emergencia de raíces laterales, la organización del meristemo de la raíz y la respuesta gravitrópica. La biosíntesis de auxinas ocurre tanto en la parte aérea de la planta como en la raíz, la auxina requerida para el desarrollo de la raíz puede venir tanto del follaje como de la raíz. Las partes aéreas de las plantas principalmente las hojas jóvenes son un sitio de gran importancia en la biosíntesis de estos compuestos (Ljung *et al.*, 2001). Las auxinas derivadas del follaje son transportadas a través de proteínas transportadoras hacia la raíz. Esto permite la formación de un gradiente de auxinas con una mayor acumulación en la parte proximal al tallo. Esta acumulación diferencial de auxinas permite una redistribución posterior hacia la zona de elongación celular y diferenciación, donde es esencial para distintos procesos morfogénicos (Rashotte *et al.*, 2000; Casimiro *et al.*, 2001). El transporte de auxinas es llevado a cabo vía transportadores de entrada y salida

del sistema de transporte polar de auxina (PAT, Fig. 4), dirigiendo la auxina hacia el ápice de la raíz (Rashotte *et al.*, 2000, Vieten *et al.*, 2007).

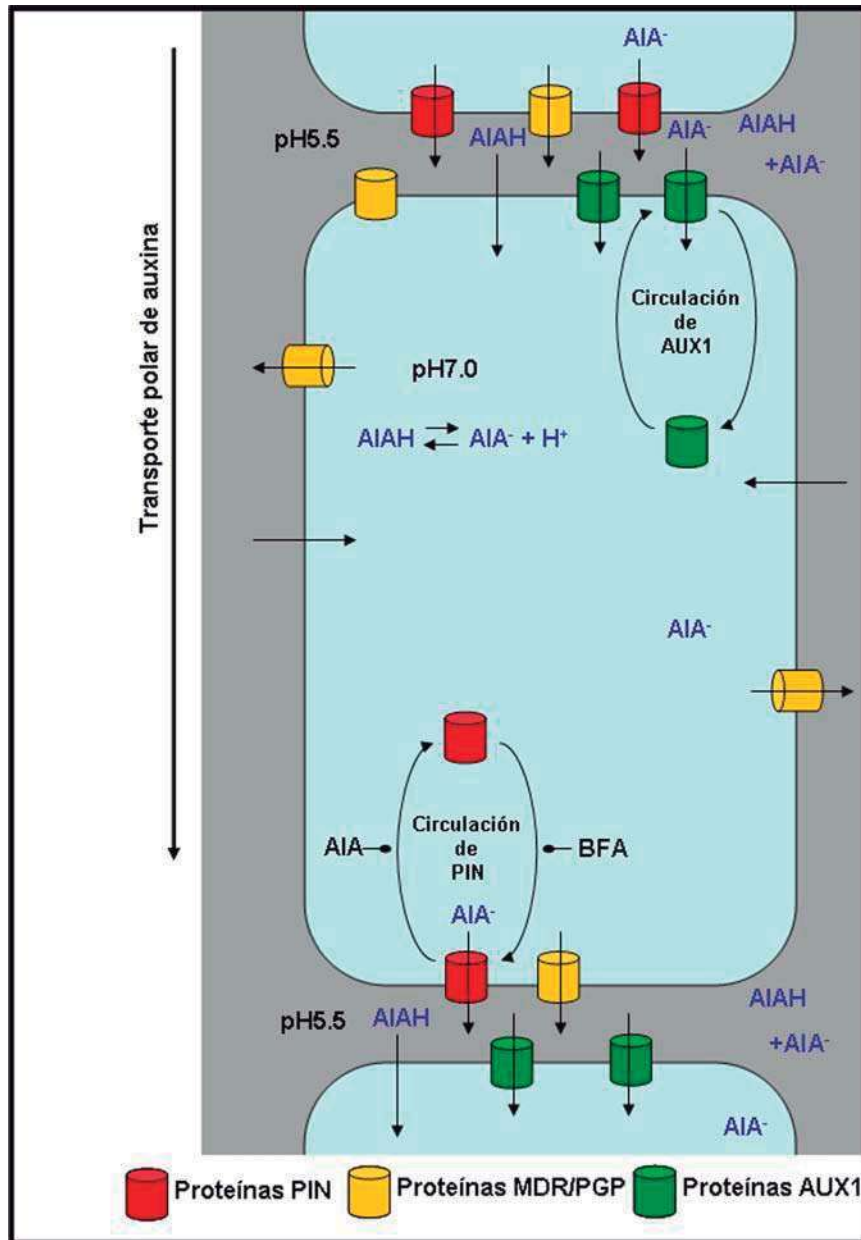
Durante el establecimiento de la arquitectura de la raíz, señales del interior y exterior de la planta son transmitidas a las células del periciclo donde ocurre la formación de las raíces laterales (Bhalerao *et al.*, 2002). Estudios genéticos han mostrado que mutantes deficientes en la respuesta a auxinas *axr2*, muestran un crecimiento de raíz y follaje agravitrópico, un hipocotilo corto y un crecimiento de la raíz resistente a auxina (Wilson *et al.*, 1990; Nagpal *et al.*, 2000) o un alterado desarrollo de raíces laterales (Casimiro *et al.*, 2003). Se ha determinado que la escasez de auxinas mantiene las células del periciclo en la fase G1 y la posterior adición promueve la transición de la fase de G1-S, promoviendo así la formación de raíces laterales (Himanen *et al.*, 2002).

## **2.5. Nuevas moléculas señal.**

Además de las auxinas y otros compuestos importantes fisiológicamente, recientemente se han descrito nuevos reguladores químicos capaces de modificar el crecimiento vegetal entre los que se incluyen el glutamato, un neurotransmisor presente en el sistema nervioso de los animales, el óxido nítrico, un vasodilatador y diferentes moléculas con estructura lipídica. Entre los lípidos destacan las *N*-aciletanolamidas y las alcanidas (Morquecho-Contreras & López-Bucio, 2007) (Fig. 5).

### **2.5.1. Glutamato.**

El glutamato (GLU) es un aminoácido crucial para el metabolismo del N, siendo producto del ciclo de GOGAT y un donador de nitrógeno para la síntesis de otros aminoácidos. Se ha indicado que el glutamato actúa como una señal para regular procesos celulares y morfogenéticos en las plantas.



**Figura 4. Modelo celular del sistema de transporte polar de auxina célula-célula.** De acuerdo a la hipótesis quimiosmótica, un gradiente de pH a través de la membrana plasmática permite la acumulación de AIA en la célula. Un alto pH en el interior de la célula causa que las moléculas de AIA se disocien, haciéndola incapaz de pasar de manera pasiva a través de la membrana. Los acarreadores de salida de auxinas (PINs, algunos MDR/PGPs) son necesarios para transportar auxinas hacia el exterior de la célula. Además de la difusión simple de moléculas de AIA no disociadas en el interior de la célula, los acarreadores de entrada (AUX1) transportan los aniones de auxina (AIA<sup>-</sup>) hacia el interior de la célula. La localización subcelular polar de las proteínas PINs es importante para la dirección del transporte de auxinas (Modificado de Vieten *et al.*, 2007).

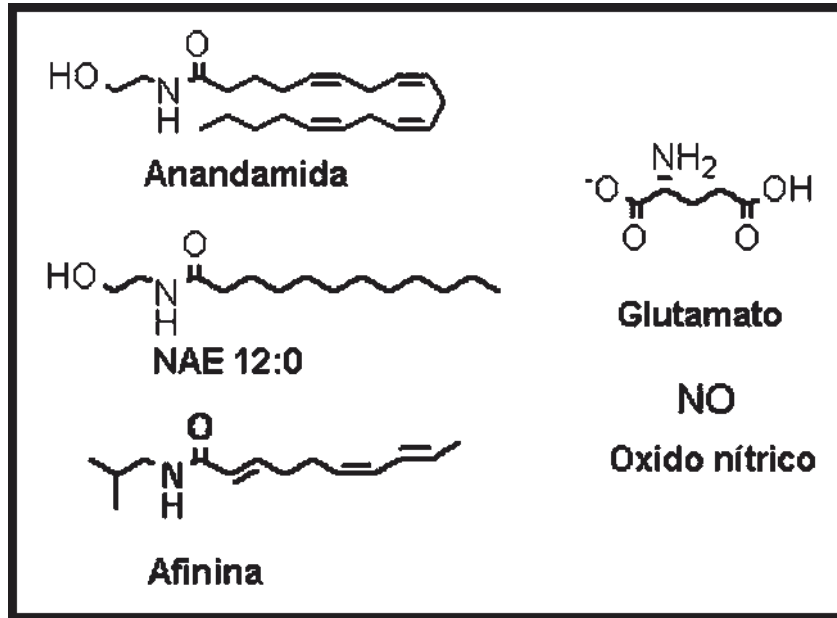


Figura 5. Estructura química de señales con funciones novedosas en las plantas.

Concentraciones milimolares de L-GLU inhiben la actividad mitótica en el meristemo de la raíz e incrementa la expansión radial de las células dando lugar a la formación de raíces primarias cortas, aunque no interfiere con la iniciación de primordios de raíces laterales.

El glutamato actúa a través del reconocimiento de receptores de glutamato (GLRs). En *Arabidopsis thaliana* se han descrito una familia de 20 genes homólogos que codifican para receptores de glutamato en animales (Morquecho-Contreras & López-Bucio, 2007).

### 2.5.2. Óxido nítrico.

El óxido nítrico (NO) es una molécula difusible involucrada en diversos procesos fisiológicos. En animales participa en varias funciones como la vasodilatación, la neurotransmisión y la respuesta inmune. En plantas juega un papel crucial en diversos procesos, incluyendo el cierre de estomas, el crecimiento y desarrollo y la interacción con microorganismos. Además, se ha descrito que ejerce un efecto en la maduración del fruto y la senescencia; la activación de la

germinación, respuestas de defensa en plantas y la tolerancia al estrés abiótico (Vandelle *et al.*, 2007).

Recientemente en nuestro grupo de trabajo, se encontró la participación del óxido nítrico en la regulación del desarrollo de raíces adventicias a partir de explantes de *Arabidopsis thaliana* tratados con la alcalamida *N*-isobutil decanamida, (Campos-Cuevas *et al.*, 2008).

### 2.5.3. *N*-acil etanolamidas.

Las *N*-acil-etanolamidas (NAEs) se producen por la hidrólisis de un fosfolípido precursor, la *N*-acilfosfatidiletanolamida (NAPE), que constituye entre el 1-5% de los fosfolípidos de la membrana plasmática de plantas y animales, por una fosfolipasa D (PLD). En plantas de algodón, los contenidos de NAPE varían entre 1.9 y 3.2 % del total de fosfolípidos dependiendo del tejido y estado de desarrollo. Sin embargo, los niveles de NAPE cambian en respuesta al estrés. Se ha reportado que durante la respuesta a elicitores de patógenos tales como la xilanasa, los cultivos de células de tabaco en suspensión disminuyen en 5 veces los niveles de NAPE-(C<sub>14</sub>) con un correspondiente incremento de alrededor de seis veces en el contenido de NAE-(C<sub>14</sub>), lo cual sugiere una correspondiente co-regulación de los niveles de NAPE y NAE (Kilaru *et al.*, 2007).

Las NAEs de angiospermas son etanolamidas de ácidos grasos cuya longitud de la cadena acilo varía de 12 a 18 carbonos, que puede ser saturada o insaturada. Generalmente las NAEs más abundantes encontradas en plantas y vertebrados son similares, incluyendo NAE 16:0, 18:1, 18:2 y 18:3.

En plantas las NAEs se acumulan sobre todo en semillas, más que en tejido vegetativo. Inicialmente las NAEs fueron reportadas en semillas secas, encontrándose cantidades de NAEs en tomate de 0.75 µg/g, maíz 1.1 µg/g, algodón 0.75 µg/g, cacahuete 17 µg/g, alfalfa 7.4 µg/g y en *Arabidopsis thaliana* cantidades de 2 µg/g de peso fresco, siendo las NAEs 16:0 y 18:2 las más abundantes (Kilaru *et al.*, 2007; Chapman, 2004).

La anandamida es una de las NAEs de mayor importancia en vertebrados debido a su actividad como un neurotransmisor y neuromodulador y por regular algunos comportamientos como la alimentación, el miedo y la ansiedad. En la actualidad se ha establecido que la anandamida y otras NAEs poliinsaturadas se unen a los receptores canabinoides CB1 y CB2, en tanto que las NAEs saturadas o monoinsaturadas no son capaces de hacerlo (Alger, 2004). En vertebrados, las NAEs participan en la ruta de señalización de los endocannabinoides, esta ruta es inhibida por la activación de una enzima, la amido hidrolasa de ácidos grasos (fatty acid amide hydrolase, FAAH), la cual hidrolisa a las NAEs para producir su correspondiente ácido graso libre y etanolamida. Estudios recientes con ratones deficientes en FAAH revelan altos niveles de NAE 20:4, 16:0 y 18:1 en sus tejidos comparados a ratones silvestres, lo cual sugiere un papel importantes de la FAAH en el metabolismo de las NAEs. Esta ruta también se ha estudiado en plantas, en donde se ha encontrado que líneas de *Arabidopsis* con expresión alterada de FAAH muestran cambios en los niveles endógenos de NAEs. Los niveles de NAEs en plantas mutantes en FAAH fueron 30% más altos, mientras que en plantas sobreexpresantes de FAAH fueron 50% menores comparados con los encontrados en las plantas silvestres.

En trabajos recientes se ha reportados que las NAEs ejercen un efecto en el crecimiento y desarrollo de plantas de *Arabidopsis thaliana*. Blancaflor *et al.*, (2003) evaluaron los efectos de altas concentraciones de *N*-lauroiletanolamida (NAE 12:0) sobre el desarrollo temprano de la raíz, encontrando que se inhibe la elongación, en tanto se incrementa el desarrollo de los pelos radiculares y de las raíces laterales. Estos efectos morfogenéticos estuvieron asociados con alteraciones en la división celular, la organización endomembranal y el tráfico de vesículas, sugiriendo que la NAE 12:0 podría jugar un papel esencial en procesos celulares.

#### 2.5.4. Alcamidas.

Las alcamidas son metabolitos secundarios que comprenden más de 200 compuestos relacionados estructuralmente y de amplia distribución en plantas. Estas amidas han sido encontradas en más de 10 familias de angiospermas: Aristolochiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Convolvulaceae, Euphorbiaceae, Menispermaceae, Piperaceae, Poaceae, Rutaceae y Solanaceae (Ramírez-Chávez *et al.*, 2004). La estructura general de las alcamidas se origina de la condensación de un ácido graso insaturado y una amida. Aunque existen alcamidas de diferente longitud en su cadena acilo, muchas de ellas contienen un doble enlace 2E conjugado al grupo amida sustituido con un grupo *N*-isobutilo (Ríos-Chávez *et al.*, 2003).

Entre las plantas que acumulan alcamidas en sus tejidos están *Echinacea purpurea*, *Echinacea angustifolia* y *Heliopsis longipes*, comúnmente los extractos de estas plantas son utilizados en el tratamiento del resfriado común así como en el tratamiento de infecciones cutáneas y de las vías respiratorias (Ramírez-Chávez *et al.*, 2004; Raduner *et al.*, 2006).

La afinina (*N*-isobutil-2E,6Z,8E-decatrienamida) es la principal alcamida producida por la raíz de *Heliopsis longipes*, representando hasta el 1% del peso seco total. Molina-Torres *et al.* (2004) evaluaron el efecto fungistático y bacteriostático de la afinina y dos alcamidas obtenidas por reducción catalítica de la afinina: *N*-isobutil-2E-decanamida y *N*-isobutil-decanamida, encontrando que solamente la afinina presenta una actividad fungitóxica, mientras que la *N*-isobutil-2E-decanamida mostró una alta actividad bacteriostática contra *Escherichia coli* y *Erwinia caratovora*.

Las alcamidas modulan el crecimiento vegetal como lo reportan Kanbe *et al.* (1993) quienes encontraron que la amidinina, una alcamida no sustituyente aislada del hongo actinomicete *Amycolatopsis* sp., estimula la producción de biomasa en planta de arroz (*Oryza sativa*). Ramírez-Chávez *et al.* (2004) evaluaron el efecto de la afinina y dos alcamidas derivadas de la afinina (*N*-isobutil-2E-decanamida y *N*-isobutil decanamida) sobre el desarrollo de la raíz de

*Arabidopsis*. La afinina a una concentración de  $1.2 \times 10^{-4}$  M inhibió el crecimiento de la raíz primaria en un 70% comparada al control, mientras que las otras dos alcanidas derivadas de afinina resultaron ser más activas en la estimulación del crecimiento de los pelos radicales. Estos efectos de las alcanidas fueron independientes de la vía de señalización de auxinas, como lo reveló el desarrollo normal de mutantes resistentes a auxinas en respuesta a tratamientos con alcanidas y por la nula capacidad de estos compuestos para afectar la expresión de los genes marcadores de auxinas *DR5:uidA* y *BA3:uidA*.

Un estudio reciente en nuestro laboratorio indica que la longitud de la cadena acilo y el grupo amida juegan un papel crucial en la actividad biológica de las alcanidas, encontrando que la *N*-isobutil decanamida es el compuesto de mayor actividad regulando el crecimiento de la raíz primaria y la formación de raíces laterales (López-Bucio *et al.*, 2007). Este compuesto indujo la formación de estructuras similares a callos en raíces primarias, hojas ectópicas a lo largo de los peciolos de las rosetas y desarrollo de tumores sobre las láminas foliares. Esta formación de órganos ectópicos por la *N*-isobutil decanamida correlaciona con una expresión aumentada del marcador de división celular *CyCB1:uidA* y el incremento en la expresión del marcador inducible por citocininas *ARR5:uidA* tanto en las raíces como en el follaje. Además se encontró que la actividad de la *N*-isobutil decanamida interacciona con la ruta de señalización de citocininas, ya que la triple mutante de los receptores de citocininas *CRE1/AHK2/AHK3* de *A. thaliana* mostró la ausencia de la formación de órganos ectópicos y ausencia de estructuras tipo callos en las laminas de las hojas (López-Bucio *et al.*, 2007). Estos resultados indican en su conjunto que las alcanidas podrían representar una nueva clase de reguladores del crecimiento cuya ruta de señalización está en proceso de ser esclarecida.

## 2.6. Interacciones planta-microorganismo.

El efecto rizosférico primeramente descrito por Hiltner en 1904, asume que muchos microorganismos son atraídos a nutrientes exudados por las raíces de las

plantas a través de quimiotaxis. Las interacciones de las raíces de la planta con otros organismos en la rizósfera incluyen interacciones raíz-raíz, raíz-insecto y raíz-microorganismos entre otras. Estas interacciones pueden ser clasificadas como asociaciones positivas o negativas. Las interacciones positivas incluyen asociaciones simbióticas con plantas epifitas y hongos micorrizicos o la colonización por agentes de biocontrol bacteriano y bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, plant growth-promoting rhizobacteria). Las interacciones negativas incluyen la competencia y parasitismo entre plantas, la patogénesis por bacterias u hongos y el ataque de insectos. Los factores que determinan estas interacciones aún se desconocen (Bais *et al.*, 2006).

Los exudados de la raíz incluyen la secreción de iones, oxígeno libre y agua, enzimas, mucílago y diversos metabolitos primarios y secundarios que contienen carbono. Los exudados de raíz a menudo están divididos dentro de dos clases de compuestos: compuestos de bajo peso molecular, tales como aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares y otros metabolitos secundarios; mientras que exudados de alto peso molecular, tales como el mucilago (polisacáridos) y proteínas, se producen en menor cantidad (Bais *et al.*, 2006).

Los exudados de la raíz también pueden actuar como fitotoxinas (alelopatía), en el desarrollo de asociaciones entre algunas plantas parásitas y su huésped o alterando la química del suelo y sus poblaciones microbianas. Algunas plantas pueden evitar los efectos de fitotoxinas por el secuestro de las toxinas en sus vacuolas o tejidos específicos o la producción de quelantes. Por ejemplo, *Polygonella myriophylla* evita los efectos de sus propias fitotoxinas, hidroquinona y benzoquinona, por la propia producción y liberación de arbutin, un glucósido de hidroquinona (Bais *et al.*, 2006).

Se han descrito algunas bacterias promotoras del crecimiento de plantas de vida libre que actúan como estimuladoras fijando nitrógeno atmosférico, tal es el caso de *Azospirillum* spp., que secreta fitohormonas tales como auxinas, citocininas y giberelinas. Otras rizobacterias crean “suelos supresivos” para el control de enfermedades de las plantas causadas por hongos y bacterias del suelo. Los mecanismos responsables para el biocontrol incluyen competición por

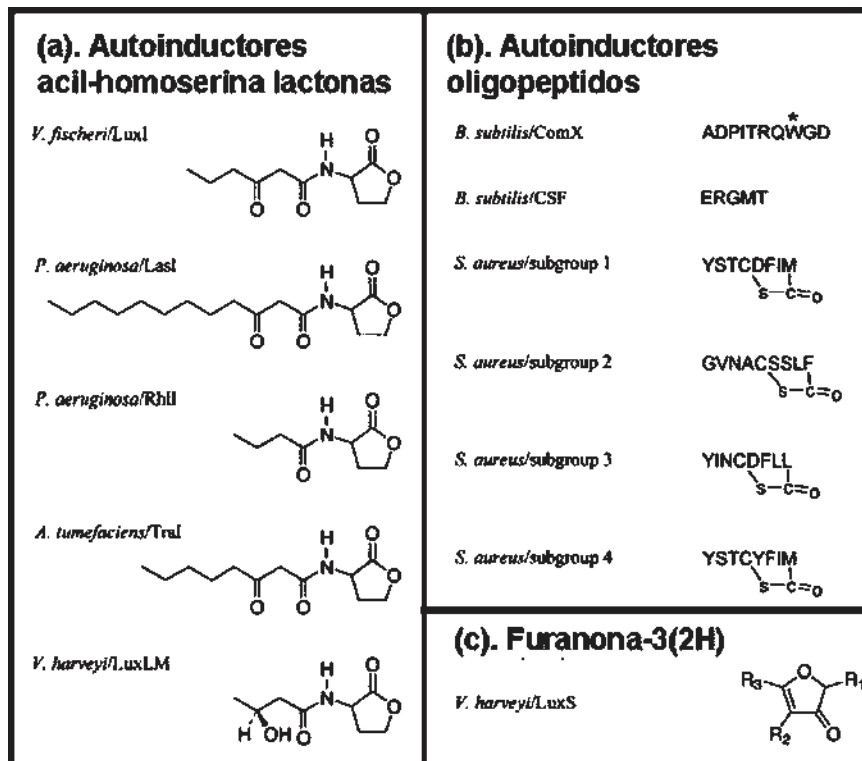
nutrientes, exclusión de nicho, resistencia sistémica inducida (ISR) y producción de metabolitos antifúngicos y/o antimicrobianos (Bais *et al.*, 2006).

## 2.7. El quorum-sensing y la comunicación celular en las bacterias.

Las bacterias utilizan moléculas pequeñas como señales químicas para la comunicación celular, esta comunicación necesita la producción, liberación y detección de factores hormonales, conocidos como autoinductores (Schauder & Bassler, 2001). Esto les permite a las bacterias coordinar la expresión de genes dependientes de la densidad poblacional, en un proceso comúnmente denominado como quorum-sensing (Fuqua *et al.*, 1994, Taga & Bassler, 2003; Reading & Sperandio, 2006).

Existen diferentes formas de comunicación entre bacterias que se agrupan de dos maneras: una es la comunicación vía péptidos y la otra es la comunicación vía acil homoserina lactonas, que son utilizadas por bacterias Gram positivas y Gram negativas respectivamente, ambas moléculas denominadas autoinductores (Fig. 6). Estas señales químicas son producidas por enzimas específicas y detectadas por receptores específicos (Parsek *et al.*, 1999; Pearson *et al.*, 1999).

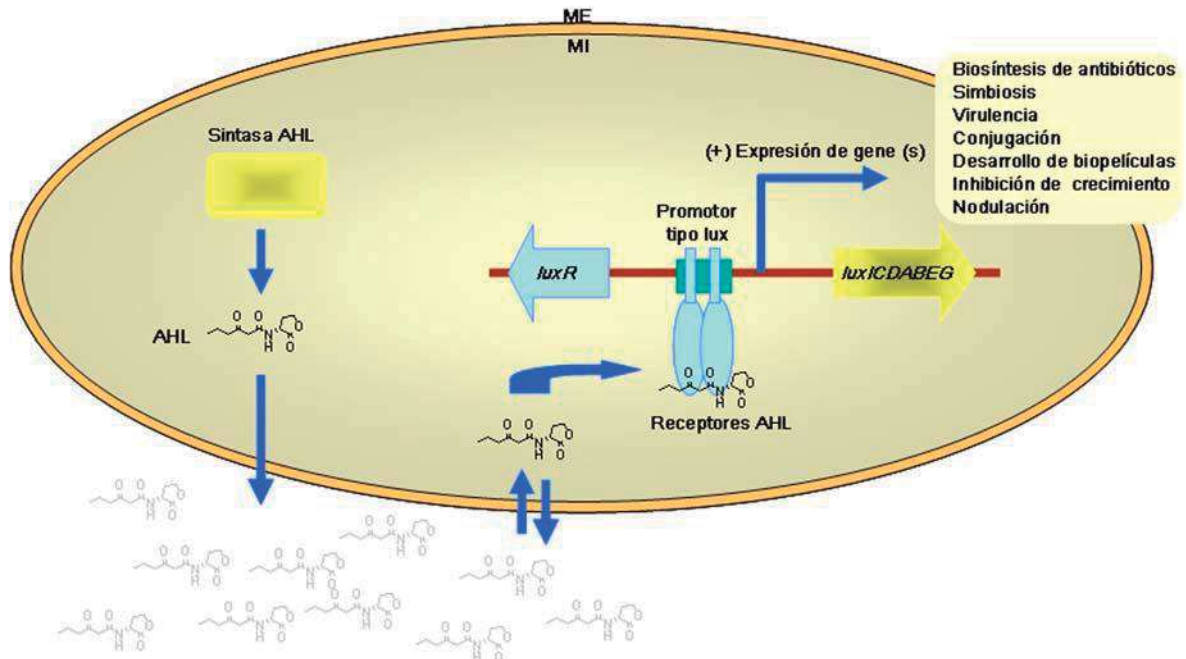
Uno de los primeros sistemas de quorum-sensing descritos es el de *Vibrio fischeri* una bacteria marina bioluminiscente que se encuentra asociada en simbiosis con organismos marinos abismales incluyendo peces y calamares (Nealson & Hastings, 1979). El sistema de quorum-sensing en *V. fischeri* está regulado por dos proteínas, LuxI y LuxR, que controlan la expresión del operón de la luciferasa (*luxICDABE*) requeridas para la producción de luz (Fig. 7). LuxI es la sintasa que produce el autoinductor 3-oxo-hexanoil-HL (3-oxo-C6-HL), y LuxR es el receptor citoplásmico, que cuyo complejo LuxR+3-oxo-C6-HL actúa como un activador transcripcional que se une al DNA, este complejo activa la transcripción del operón que codifica para la luciferasa, a su vez el complejo LuxR+3-oxo-C6-HL induce la expresión de *luxI* que se encuentra codificado en el operón de la luciferasa (Waters & Bassler, 2005).



**Figura 6.- Diferentes clases de autoinductores.** La figura muestra tres clases de moléculas usadas como autoinductores. **(a)** Representa a los autoinductores del grupo acil-homoserina lactona usados por las bacterias Gram-negativas. **(b)** Representa a los autoinductores oligopéptidos usados por las bacterias Gram-positivas. El \* sobre el autoinductor oligopéptido ComX de *B. subtilis* representa una modificación de una estructura desconocida. **(c)** Estructura general de la clase 3(2H) de furanonas. Una furanona-3(2H) se cree es un autoinductor dependiente de LuxS llamado AI-2. Tomado de Schauder & Bassler, 2001.

## 2.8. Señalización por *N*-acil-homoserina lactonas.

Diversas especies de bacterias Gram negativas usan *N*-acil homoserina lactonas (AHLs) para regular su quorum-sensing (Bosgelmez-Tinaz, 2003), estos compuestos contienen un anillo homoserina lactona (HL) conservado vinculado a una cadena (*N*)-acil de ácido graso unida a través de un enlace amida. La longitud de la cadena de ácidos grasos puede variar entre 4 a 18 carbonos, usualmente por incrementos de 2 carbonos. Estos pueden estar saturados o insaturados y con o sin sustituyentes en el carbono 3 (C-3) (Waters & Bassler, 2005; Camili & Bassler, 2006, Fuqua & Greenberg, 2002).



**Figura 7. Mecanismo de quorum-sensing en *Vibrio fischeri*.** Un circuito de señalización tipo LuxIR. La estructura química del compuesto AHL (3-oxo-hexanoil-HL) es producido por la sintasa LuxI y excretado hacia el exterior de la célula. Un receptor tipo LuxR reconoce a 3-oxo-hexanoil-HL y se une a la región del promotor tipo Lux que regula la expresión del gen(es). ME, membrana externa; MI, membrana interna.

Las proteobacterias poseen proteínas homólogas tipo LuxIR y se comunican con señales AHL (Manefield & Turner, 2002). Sin embargo, se han identificado más de un miembro de la familia de sintasas LuxI que catalizan la producción de AHLs, muchas de estas proteínas tipo LuxI contienen una longitud de 190-230 aminoácidos y un 30-35% de identidad, manteniendo un residuo de treonina conservado en la posición 143.

*Pseudomonas aeruginosa* es uno de los ejemplos más estudiados del sistema de quorum-sensing, esta bacteria utiliza dos sistemas: el sistema LasR-LasI y el sistema RhIR-RhII regulados por 3-oxo-dodecanoil-HL (3-oxo-C12-HL) y butanoil-HL (C4-HL) respectivamente. Sin embargo se han descrito otras familias de sintasas de AHLs: la familia LuxM, AinS y VanM proteínas de *Vibrio harveyi*, *V. fischeri* y *V. anguillarum*, requeridas para la producción de 3-OH-C4-HL, C8-HL y 3-OH-C6-HL respectivamente, que no muestran similitud en la secuencia con LuxI. Recientemente, se ha descrito la proteína HdtS de *Pseudomonas fluorescens*, distinta a LuxI y AinS (Fuqua & Greenberg, 2002).

Diversos procesos en las bacterias están regulados por quorum-sensing, incluyendo la simbiosis, la virulencia, la producción de antibióticos y la formación de biopelículas (Schauder & Bassler, 2001). *P. aeruginosa* es una bacteria Gram negativa aislada del suelo, agua y plantas y es un patógeno oportunista en humanos infectando pacientes inmunocomprometidos o en pacientes con infecciones crónicas pulmonares como la fibrosis quística, además puede infectar otros organismos como insectos, nematodos y plantas. Esta facilidad de infección de *P. aeruginosa* es debido a la producción de factores de virulencia, mecanismos de resistencia a multidrogas y formación de biopelículas (Walker *et al.*, 2004).

## **2.9. Participación de las N-acil homoserina lactonas en la interacción planta-bacteria.**

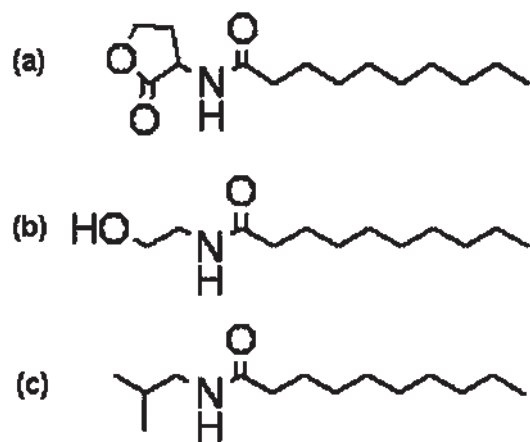
En *Pseudomonas aeruginosa* del 5 al 20% de los genes están sujetos a la regulación por el quorum-sensing (Bauer *et al.*, 2005). Esta bacteria posee principalmente los sistemas de quorum-sensing, LasR-LasI y RhIR-RhII regulados por 3-oxo-C12-HL y C4-HL, respectivamente. Las bacterias asociadas a plantas son capaces de comunicarse por medio de AHLs, lo que ha planteado la posibilidad de que las plantas son capaces de reconocer estos compuestos y responder ajustando su metabolismo (Elasri *et al.*, 2001; Cha *et al.*, 1998; Khmel *et al.*, 2002; D'Angelo-Piccard *et al.*, 2005; Pierson & Pierson, 2007).

Un primer reporte indicando que las plantas pueden percibir las AHLs fue publicado por Mathesius y colaboradores (2003), quienes mostraron que plantas de *Medicago truncatula* responden a la aplicación de AHLs mediante cambios en la producción de proteínas, afectando en un rango amplio las funciones en *M. truncatula*, incluyendo respuestas de defensa y estrés, regulación transcripcional, procesamiento de proteínas, respuestas a hormonas de la planta y elementos de citoesqueleto, así como también el metabolismo primario y secundario. Posteriormente se encontró que la presencia de bacterias productoras de acil homoserinas lactonas en la rizósfera de tomate induce respuestas de defensa dependientes de ácido salicílico y etileno, las cuales juegan un papel importante

en la activación de resistencia sistémica en plantas y confiere resistencia al hongo patógeno *Alternaria alternata* (Schuhegger *et al.*, 2006). El hecho de que ciertas mutantes de *Rhizobium* alteradas en la producción o respuesta a AHLs fueron incapaces de nodular plantas de leguminosas respalda la hipótesis de que las AHLs pueden participar en las interacciones planta-bacteria (Rosemeyer *et al.*, 1998; Daniels *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2006).

Diversos estudios sugieren que las plantas producen compuestos que afectan el quorum-sensing regulando respuestas en las bacterias. Gao *et al.*, (2003), encontraron en exudados de la raíz de plantulas de *Medicago truncatula* al menos 15 sustancias separables cromatográficamente capaces de estimular o inhibir respuestas en bacteria reporteras de QS. Otro estudio muestra que metabolitos secundarios de plantas como el ácido salicílico, que juega un papel importante en varios procesos fisiológicos, como la resistencia sistémica al ataque de patógenos, regula los factores de virulencia de *P. aeruginosa* PA14 la cual muestra una reducida formación de biopelícula en las raíces de *Arabidopsis thaliana* (Prithiviraj *et al.*, 2005).

Las plantas producen compuestos con similitud estructural a AHLs, incluyendo *N*-acil-etanolamidas (NAEs) y alcanamidas. La similitud estructural química de la *N*-decanoil homoserina lactona (C10-HL, un compuesto del QS bacteriano) con la NAE 10:0 y la *N*-isobutil decanamida (Fig. 8), nos permite hipotetizar que las AHLs podrían alterar el desarrollo de las plantas. Las AHLs están compuestas de una cadena acilo unida a una amida, siendo la más importante diferencia la presencia de un anillo lactona en la cadena en AHLs, que está ausente en las NAEs y alcanamidas.



**Figura 8. Similitud estructural de C10-HL y compuestos relacionados de plantas. (a) *N*-decanoil-HL (C10-HL). (b) *N*-etanol decanamida (NAE 10:0). (c) *N*-isobutil-decanamida.**

### **3. JUSTIFICACIÓN.**

Considerando la similitud estructural de las *N*-acil-L-homoserinas lactonas con la *N*-isobutil decanamida y que ésta última regula el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*, es importante determinar si los autoinductores bacterianos son reconocidos por las plantas para modular su crecimiento y desarrollo.

### **4. HIPÓTESIS.**

Las *N*-acil-L-homoserinas lactonas actúan como reguladores del crecimiento y desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

## 5. OBJETIVOS.

### 5.1. Objetivo general.

Caracterizar los efectos morfológicos y moleculares de las *N*-acil-L-homoserina lactonas sobre el sistema radicular de *Arabidopsis thaliana*.

### 5.2. Objetivos particulares.

- Evaluar los efectos de las *N*-acil-L-homoserinas lactonas sobre la germinación y el desarrollo de la raíz de *A. thaliana*.
- Evaluar el efecto de las *N*-acil-L-homoserinas lactonas en la expresión de marcadores de división, diferenciación celular y de respuesta a auxinas.
- Estudiar los efectos de la inoculación con bacterias productoras de *N*-acil-L-homoserinas lactonas en el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana*.
- Estudiar los efectos de la inoculación de mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 en los sistemas de quorum-sensing en el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana*.
- Determinar el perfil de producción de *N*-acil-L-homoserinas lactonas en cepas de *Pseudomonas* promotoras del crecimiento.

## 6. MATERIALES Y METODOS.

### 6.1. Material biológico y condiciones de crecimiento.

En todos los experimentos se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col-0) y las líneas transgénicas *pPRZ1:uidA* (Sieberer *et al.*, 2003), *CyCB1:uidA* (Colón-Carmona *et al.*, 1999), *pAtEXP7:uidA* (Cho & Cosgrove, 2002), *DR5:uidA* (Ulmasov *et al.*, 1997), y las líneas *AtFAAH* sobreexpresante OE2A y mutante KO118043 (Wang *et al.*, 2006). Así también las mutantes resistentes a auxinas, *aux1-7* (Pickett *et al.*, 1990), *doc1* (Li *et al.*, 1994), *axr2* (Wilson *et al.*, 1990); *rhd6* (Masucci & Schiefelbein, 1994). Las semillas fueron desinfectadas con etanol al 95% (v/v) por 5 minutos y cloro 20% por 7 minutos. Posteriormente se realizaron cinco enjuagues con agua destilada estéril, las semillas fueron germinadas y crecidas en cajas Petri con agar que contenía medio MS 0.2 x (Murashige & Skoog, 1962). El medio MS (Mezcla de sales basales Murashige & Skoog, Cat. M5524) fue comprado a la casa Sigma. La formulación sugerida es de 4.3 g/l de sales para una concentración 1x del medio, se utilizó 0.9 g/l, al cual referimos como MS 0.2x. Este medio carece de aminoácidos y vitaminas. Las *N*-acil-L-homoserinas lactonas fueron adquiridas en la casa Sigma. Los compuestos disueltos en etanol se agregaron al medio líquido (50 °C), que se utilizó para la preparación de las placas de Petri. El fitagar (grado micropropagación) se adquirió en la casa Phytechnology (Shawnee Misión, KS, USA). Las plantas fueron colocadas en un cámara de crecimiento para plantas (Percival Scientific AR-95L) con un fotoperiodo de 16 horas luz, 8 horas oscuridad, una intensidad de luz de 100  $\mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$  y una temperatura de 22 °C.

### 6.2. Cepas bacterianas.

Las cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y mutantes de PAO1 en el sistema del quórum-sensing (Li *et al.*, 2007), *P. putida* y *P. fluorescens* (Aguilar *et al.*, 2006) fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología

Microbiana del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, a cargo del Dr. Jesús Campos García. Todas las cepas fueron crecidas en placas con medios agar Luria Bertani (LB) e incubadas a 37 °C por 12 h.

### **6.3. Ensayos de inoculación bacteriana.**

Se utilizaron plántulas de *A. thaliana* crecidas en medio MS 0.2x para los ensayos de inoculación *in vitro*. Las cepas bacterianas se propagaron en medio LB sólido por 12 hrs. La cepa bacteriana fue inoculada junto a las plantas en medio MS 0.2x. Cada cepa bacteriana fue inoculada a una distancia de 6 centímetros de distancia de la punta de la raíz y crecida por un periodo de 8 días posteriores a la inoculación a una temperatura de 22 °C. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

### **6.4. Purificación de AHLs de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y análisis por HPLC y GC-MS.**

Las AHLs se purificaron a partir de cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, la cepa se inocula en 300 mL de medio Luria Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989) a 30 °C en agitación. Las células y el cultivo se separan por centrifugación a 10,000 g por 10 min a 25 °C utilizando una centrífuga Termo IEC Centra CL5R (Termo Electron Corporation, Milford, MA, USA). Las AHLs se extrajeron del medio de cultivo con dos volúmenes de acetato de etilo adicionado con ácido acético a 0.1 mL/L. Los extractos se colectaron y el acetato de etilo se evaporó 60 °C utilizando un Rotavapor R-210 (Büchi Labortechnik AG, Meierseggrasse, Postfach, Switzerland). Las muestras se disolvieron en 1 mL de metanol:acetato de etilo (1:1) y sujetos al análisis por HPLC, GC-MS o purificación con HPLC.

Las AHLs fueron detectadas con luz UV a 210 nm por un detector de fotodiodos (Photodiode Array Detector, PAD) ProStar 335 utilizando un sistema de HPLC ProStar (Varian Inc.). La separación fue llevada a cabo utilizando una columna de fase reversa C<sub>18</sub> Microsorb-MV 100-5 (Varian Inc.) bajo el siguiente

programa de separación usando las soluciones A:B. Iniciando con el sistema de calibración 0:100; seguido de un gradiente linear hasta 60:40, un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup> por 10 min; un gradiente linear hasta una proporción 90:10, con un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup> por 3 min, y una fase de equilibrio de 2 min a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. La solución A, acetonitrilo 100% y la solución B, agua desionizada. Las soluciones se filtraron y desgasificaron. Para la purificación de AHLs, 1 mL del extracto de acetato de etilo se aplica al sistema de HPLC utilizando una columna semi-preparativa Econosil C<sub>18</sub> 10 U 250 mm x 22 mm (Alltech) bajo las siguientes condiciones de separación: solución A:B: iniciando con un sistema de calibración 0:100; seguido de una gradiente linear hasta una proporción 60:40, con un flujo de 5 mL min<sup>-1</sup> por 40 min; un gradiente linear hasta una proporción 90:10, con un flujo de 5 mL min<sup>-1</sup> por 10 min; un gradiente linear hasta una proporción 0:100, con un flujo de 5 mL min<sup>-1</sup> por 5 min, y una calibración de 15 min a un flujo de 5 mL min<sup>-1</sup>. La solución A fue acetonitrilo al 100% y la solución B agua desionizada se filtraron y desgasificaron. La detección de AHLs se realiza a 210 nm y los picos se colectan y concentran utilizando un liofilizador Freezone 6 (Labconco, Kansas city, Missouri, USA). Los compuestos así purificados se evaluaron en bio-ensayos utilizando plantas de *Arabidopsis thaliana* como se describe en el siguiente apartado.

La identificación de los compuestos se realizó por cromatografía de gases acoplada a masas. Para ello, las muestras de AHLs de *P. aeruginosa* se sometieron a un análisis de GC-MS en un cromatógrafo Hewlett Packard Series II Gas chromatograph 5890 y Hewlett Packard Mass spectrometer 5989B, utilizando una columna DB-5Ms, longitud de 30 m, I.D. 0.25 mm, Film 0.25 µm de J & W Scientific. El análisis se realizó a 60 °C por 2 min, incrementando hasta 135 °C (25 °C min<sup>-1</sup>) y después se incrementó la temperatura hasta 210 °C (5 °C min<sup>-1</sup>). Como estándares de utilizaron AHLs comerciales (Sigma-Aldrich).

### **6.5. Bio-ensayos con AHLs colectadas y purificadas de *P. aeruginosa* PAO1.**

Los picos colectados y concentrados fueron disueltos en 100  $\mu$ L de etanol, posteriormente 50  $\mu$ L de cada uno de los picos colectados se adicionaron a 100 mL de medio MS 0.2x. En el tratamiento control se adicionó la cantidad del solvente utilizada para disolver cada uno de los picos colectados. Las semillas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col-0) se desinfectaron superficialmente y se analizó el crecimiento de la raíz bajo diferentes concentraciones de los extractos.

### **6.6. Análisis de crecimiento vegetal.**

En los diferentes bioensayos, el crecimiento de la raíz primaria se registró utilizando una regla. El número de raíces laterales se determinaron mediante el conteo de raíces laterales presente en la raíz primaria, desde el ápice hasta la zona de transición entre la raíz y el tallo. La densidad de raíces laterales se determinó dividiendo el número de raíces laterales sobre la longitud de la raíz primaria. Los pelos radicales se contabilizaron en una región de 500  $\mu$ m cercana al meristemo de la raíz. La longitud promedio de los pelos radicales se determinó midiendo 10 pelos, tomando como referencia el plano protoxilemático que localiza la base del pelo radical en la célula de la epidermis. El peso fresco de las plantas se determinó con una balanza analítica Ohaus con un valor de precisión de 0.0001 g. Para todos los experimentos, los datos fueron analizados estadísticamente en el programa SPSS 10 (SPSS, Chicago). Para evaluar diferencias en las respuestas de crecimiento y desarrollo de la raíz, se realizaron análisis de varianza y pruebas de significancia de Tukey. En las diferentes gráficas, se indican con distintas letras las medias que difieren significativamente ( $P < 0.05$ ).

### **6.7. Análisis histoquímico de actividad de GUS.**

Las plantas transgénicas que expresan el gene reportero *uidA* (Jefferson *et al.*, 1987) se procesaron con X-Gluc 0.1% (5-bromo-4-cloro-3-indolil,  $\beta$ -D-

glucuronido) en amortiguador de fosfatos ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.1M, pH 7) con 2 mM ferrocianuro de potasio y 2 mM ferricianuro de potasio, durante 12 horas a 37 °C. Las plantas se clarificaron y fijaron con 0.24 N HCl en metanol 20% (v/v) durante 60 min a 62 °C. La solución se sustituyó por NaOH 7% (v/v) en etanol 60% (v/v) durante 20 min a temperatura ambiente. Las plantas se hidrataron con tratamientos de etanol a 40, 20 y 10% (v/v) por 24 horas en cada periodo. Finalmente se substituye el etanol con glicerol 50% (v/v). Las raíces procesadas se incluyeron en portaobjetos para su análisis.

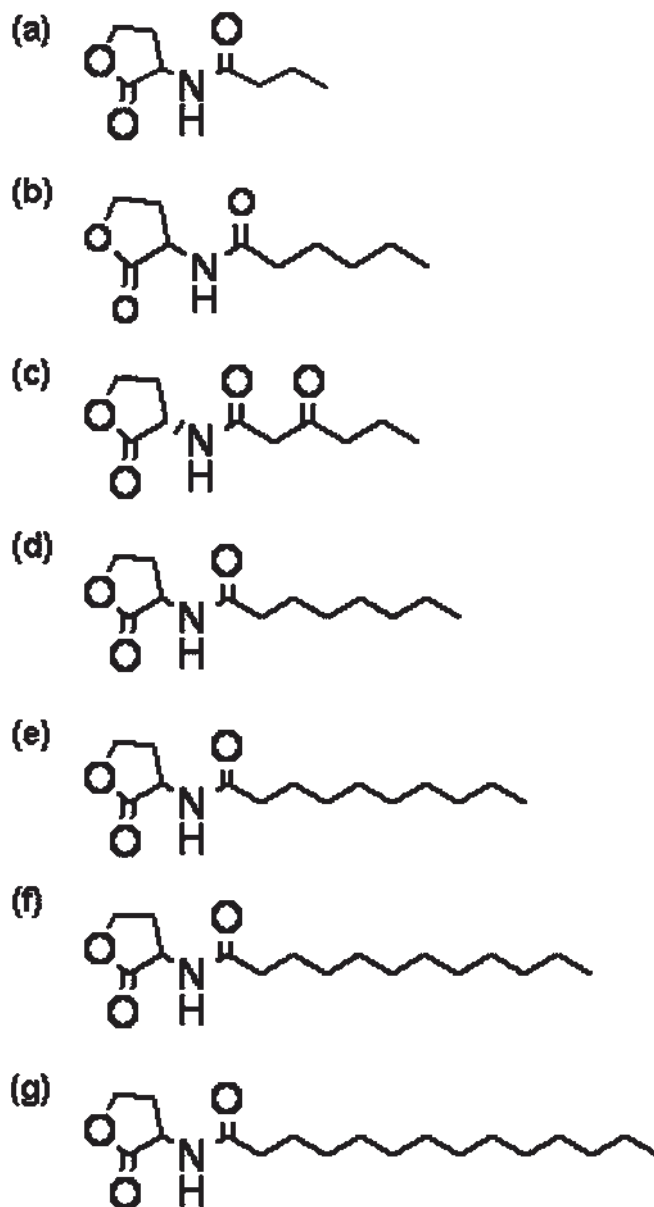
### **6.8. Microscopía.**

El sistema radicular de *A. thaliana* se analizó con un microscopio estereoscópico (Leica MZ6). El número de raíces laterales se contabilizaron a un aumento de 30x. Los primordios de la raíz primaria y de las raíces laterales se analizaron en preparaciones semi-permanentes de raíces utilizando un microscopio compuesto (Axiostar Zeiss Pluss) en aumentos de 100x o 400x. Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital SONY Cybershot DSC-S75 adaptada al microscopio y procesadas con el software Zeiss Axio Vision 4AC.

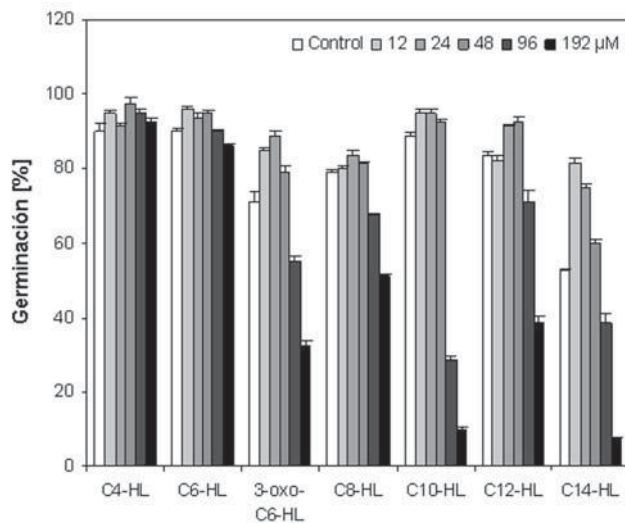
## 7. RESULTADOS.

### 7.1. Efectos de las AHLs en la germinación de *Arabidopsis*.

Las AHLs son una clase diversa de hormonas utilizadas por las bacterias Gram negativas para la comunicación celular. Bacterias Gram negativas productoras de AHLs se encuentran asociadas a plantas ejerciendo un efecto rizosférico por la secreción de estos compuestos que alcanzan concentraciones de hasta 100  $\mu\text{M}$  en el suelo (Schuhegger *et al.*, 2006). La hipótesis de que las plantas pueden reconocer las AHLs se investigó creciendo plantas de *Arabidopsis* bajo diferentes concentraciones de estos compuestos (Fig. 9). Inicialmente, se evaluaron los efectos de siete AHLs con diferente longitud de cadena del ácido graso sobre la germinación en medio MS 0.2x suplementado con concentraciones desde 12 hasta 192  $\mu\text{M}$  y cuantificando el número de plantas germinadas tomando como criterio el rompimiento de la testa de la semilla por la radícula. AHLs de cadena corta (C4 y C6) no afectaron significativamente la germinación, por el contrario; AHLs de cadena media (C8-C14) mostraron una inhibición dosis dependiente, interesantemente, concentraciones cercanas a las encontradas en el ambiente estimadas en alrededor de 100  $\mu\text{M}$  según Schuhegger *et al.*, (2006) modificaron la germinación. Concentraciones de C10-HL de 96  $\mu\text{M}$  causaron una inhibición del 70 %. Sin embargo, concentraciones menores a 96  $\mu\text{M}$  (24 a 48  $\mu\text{M}$ ) mostraron un efecto estimulador de la germinación. Efectos similares se observan con C14-HL, que incrementa la germinación en un 30 y 15 %, respectivamente (Fig. 10). Encontramos que los efectos de las AHLs son dependientes de la estructura y la concentración del compuesto. Estos resultados nos muestran la importancia de las AHLs en la regulación del desarrollo en plantas desde procesos embrionarios.



**Figura 9. Estructuras químicas de las *N*-acil-homoserinas lactonas usadas en este estudio:** (a) *N*-butanoil-homoserina lactona (C4-HL), (b) *N*-hexanoil-homoserina lactona (C6-HL), (c) *N*-3-oxo-hexanoil-homoserina lactona (3-oxo-C6-HL), (d) *N*-octanoil-homoserina lactona (C8-HL), (e) *N*-decanoil-homoserina lactona (C10-HL), (f) *N*-dodecanoil-homoserina lactona (C12-HL), (g) *N*-tetradecanoil-homoserina lactona (C14-HL).



**Figura 10. Efecto de las AHLs en la germinación de *Arabidopsis*.** Las semillas de *A. thaliana* se sembraron en medio MS 0.2x con la concentración de AHL indicada y el porcentaje de germinación se cuantificó a las 24h. Los valores mostrados representan la media  $\pm$  desviación estándar ( $n=90$ ). Los experimentos fueron repetidos tres veces con resultados similares.

## 7.2. Efecto de las AHLs sobre la arquitectura del sistema radicular de *Arabidopsis*.

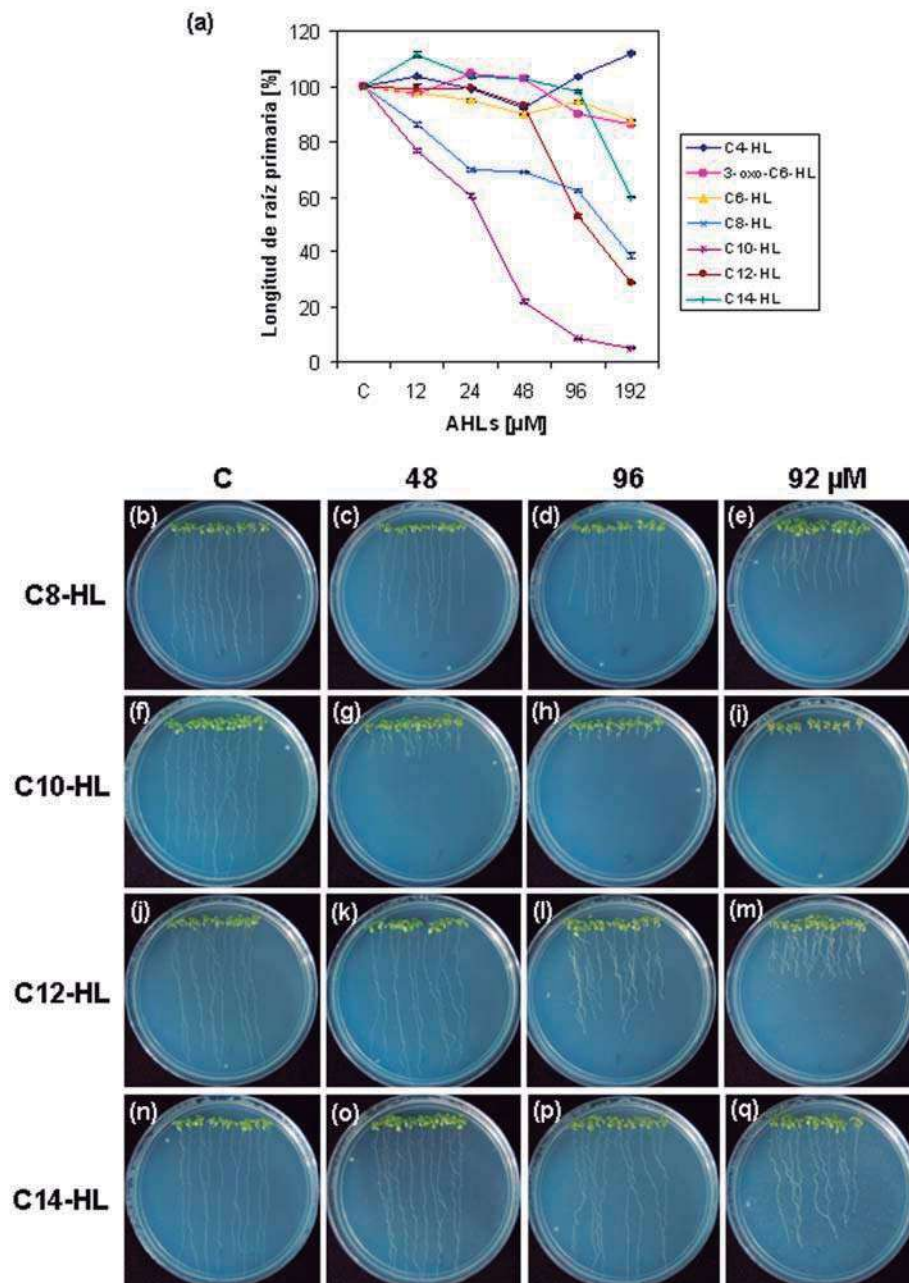
El sistema radicular de *Arabidopsis thaliana* resulta de gran utilidad para el estudio de procesos de desarrollo post-embrionario por su simplicidad del tejido radicular y su fácil manejo. Se han descrito tres principales procesos que determinan la arquitectura del sistema radicular: (1) crecimiento de la raíz primaria, (2) formación de raíces laterales y (3) desarrollo de pelos radiculares, estos contribuyen a la capacidad de absorción total de agua y nutrientes. A continuación se estudió el efecto de las AHL sobre cada uno de estos tres aspectos morfogénéticos.

Para determinar el efecto de las AHLs en el crecimiento de la raíz, se germinaron plantas de *Arabidopsis* en medio MS 0.2x suplementados con concentraciones de AHLs desde 12 a 192  $\mu$ M y la longitud de la raíz primaria fue registrada a los 10 días después de la germinación (d.d.g.). Los resultados indican que las AHLs afectan el crecimiento de una manera dependiente de la estructura y de la concentración de cada compuesto. Las AHLs de cadena corta (C4 y C6) no

afectaron significativamente el crecimiento (Fig. 11a). Por el contrario, AHLs de cadena media mostraron efectos inhibitorios dosis-dependientes sobre el crecimiento de la raíz primaria, de los cuales la C10-HL mostró una mayor actividad biológica (Fig. 11a). Concentraciones de C10-HL de 48  $\mu$ M causaron un 80 % de reducción en la longitud de la raíz primaria. Interesantemente, la disminución de la longitud de la raíz primaria por el tratamiento de la AHL se acompañó por un cambio en la arquitectura del sistema radicular hacia un sistema de exploración altamente ramificado (Fig. 11b-q). Efectos similares también se observan en plantas tratadas con C8, C12 y C14-HL aunque en concentraciones mayores a 96  $\mu$ M (Fig. 11b-q). Estos resultados indican que la longitud de la cadena de ácido graso es de gran importancia para la actividad de las AHL para alterar la arquitectura del sistema radicular en *Arabidopsis*.

### **7.3. Efecto de la C10-HL en el desarrollo de las raíces laterales en *Arabidopsis*.**

El efecto de las AHLs en la estimulación del desarrollo de raíces laterales puede ser debido a una estimulación en la emergencia de PRL pre-existentes o a la formación *de novo* de PRL adicionales. Los PRL formados en la raíz primaria se cuantificaron a los 7 d.d.g. en plantas de *Arabidopsis* que expresan el marcador *pPRZ1:uidA* y permite visualizar PRL en las diferentes etapas. Las plantas de *pPRZ1:uidA* fueron crecidas por 6 d en medio MS 0.2x suplementados con concentraciones de 12 a 192  $\mu$ M de C10-HL, y después se procesaron para determinar la actividad histoquímica de la  $\beta$ -glucuronidasa. Cada PRL fue clasificado de acuerdo a los estados de desarrollo reportados por Zhang *et al.* (1999), quien considera los siguientes estados: estado A, hasta tres capas celulares; estado B, sin emerger, de más de tres capas celulares; estado C, raíz lateral emergida de menos de 0.5 mm en longitud; estado D, raíz lateral de más de 0.5 mm.



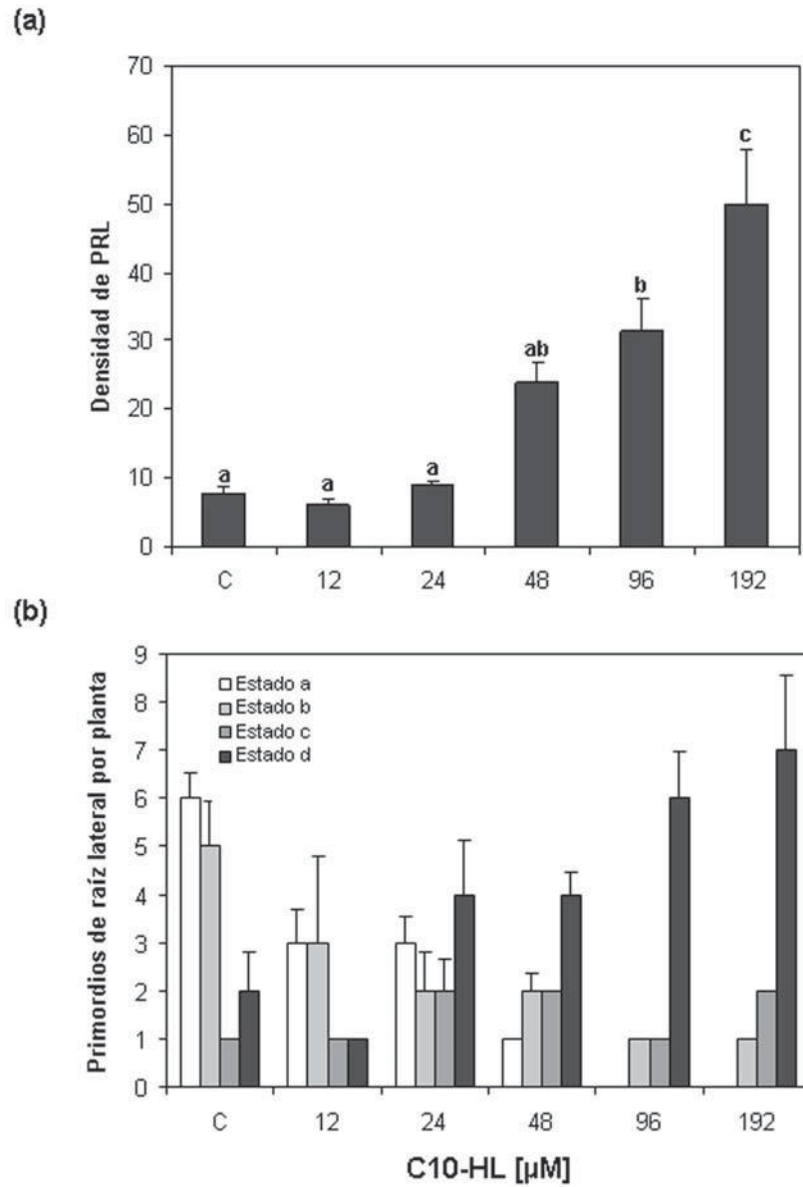
**Figura 11. Efecto de las AHLs sobre el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis*.** Plantas de *Arabidopsis thaliana* fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2x durante 10 días y la longitud de la raíz primaria se cuantificó con una regla. **(a)** Se presenta el porcentaje de inhibición del crecimiento de la raíz primaria de plantas tratadas con AHL comparado con plantas crecidas en medios suplementados con el solvente solamente. **(b-q)** Efectos diferenciales de las AHLs sobre la arquitectura del sistema radicular. Se presentan fotografías representativas de plantas crecidas en medio suplementado con el compuesto indicado. Los valores mostrados representan la media  $\pm$  desviación estándar ( $n=30$ ). El experimento fue repetido tres veces con resultados similares.

La densidad de PRL (número de PRL  $\text{cm}^{-1}$ ) muestra que las plantas tratadas con 48  $\mu\text{M}$  o concentraciones mayores de C10-HL forman un número mayor de PRL. En la concentración de 192  $\mu\text{M}$  de este compuesto se encontró un incremento de cinco veces en la densidad de PRL cuando es comparado con plantas control tratadas con el solvente (Fig. 12a). La distribución de los estados de desarrollo de PRL también fue afectada por la C10-HL. Tratamientos de 24 a 192  $\mu\text{M}$  de C10-HL incrementaron el número de PRL en estado D comparado con el control (Fig. 12b). Estas observaciones sugieren que la C10-HL incrementa la densidad de PRL y la transición de PRL de estados de desarrollo tempranos (estados A, B y C) a un estado de desarrollo avanzado (estado D) y explican el efecto promotor de la ramificación radicular observado en las plantas tratadas con AHLs.

#### **7.4. Efecto de las AHLs sobre el desarrollo de los pelos radiculares.**

Los pelos radiculares son células especializadas de la epidermis que participan en la captación de nutrientes y agua. Para determinar si las AHLs alteran el desarrollo de los pelos radiculares, se realizaron experimentos en los que plantas silvestres de *Arabidopsis* fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2x con diferentes concentraciones de AHLs.

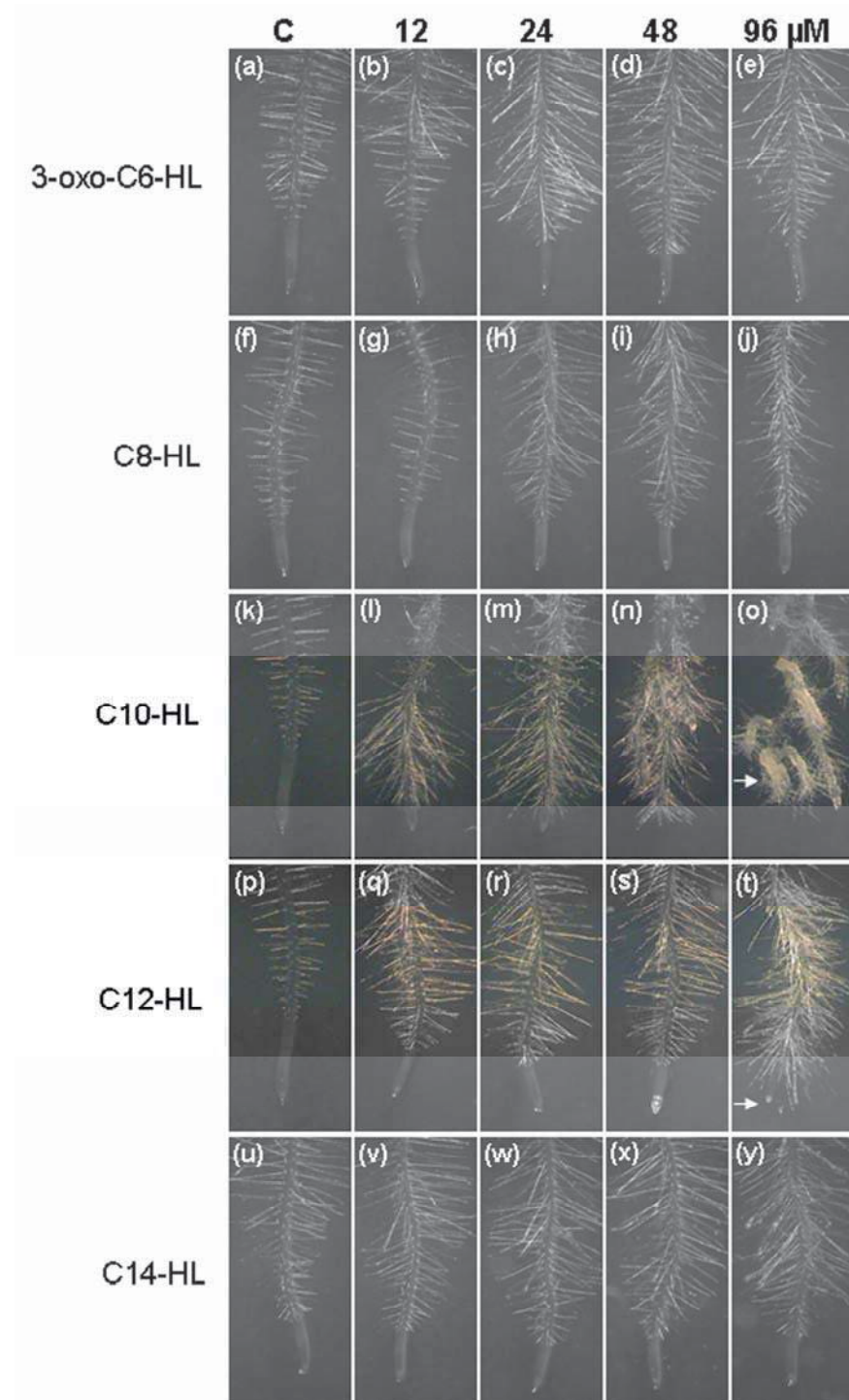
La figura 13 muestra fotografías representativas de los pelos radiculares que se forman en las diferentes concentraciones de AHLs. Las plantas control tratadas con el solvente muestran la organización celular típica del ápice de la raíz primaria, con la formación de pelos radiculares pequeños en la región proximal al meristemo (Fig. 13a). Las AHLs de cadena corta (C6 y C8) no afectan el desarrollo de los pelos radiculares (Fig. 13b-j), mientras que las C10 y C12-HL alteraron el desarrollo de pelos radiculares en una manera dosis-dependiente.



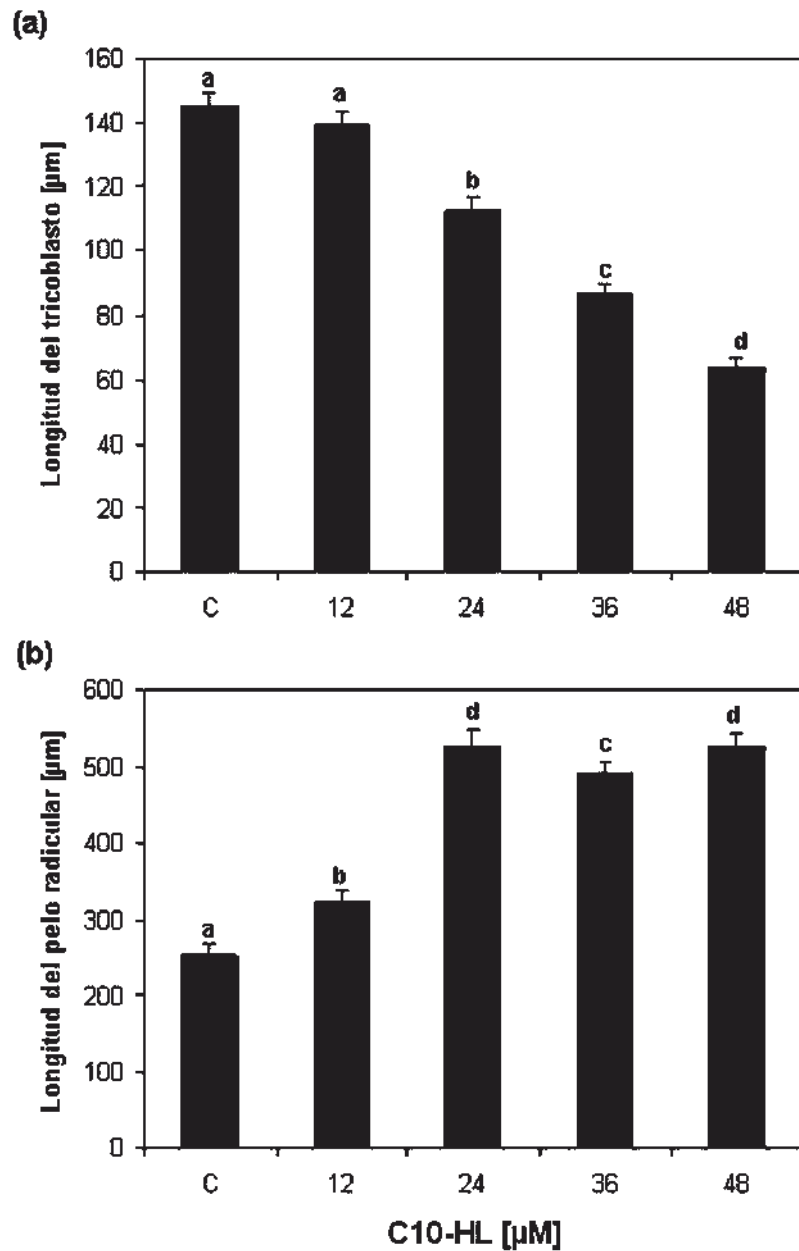
**Figura 12. Efectos de la C10-HL en el desarrollo de raíces laterales de *Arabidopsis*.** (a) Densidad de primordios de raíz lateral (número de PRL  $\text{cm}^{-1}$ ), (b) Distribución de las diferentes etapas de desarrollo de PRL. Plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresan el marcador *pPRZ:uidA* fueron crecidas por 10 d en medio MS 0.2x suplementado con la concentración indicada de C10-HL. Las plantas fueron procesadas para la detección histoquímica de la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa y clarificadas para mostrar la expresión del gen. Los resultados representan la media  $\pm$  desviación estándar. ( $n=10$ ). Este análisis fue repetido dos veces con resultados similares. Las diferentes letras indican una diferencia estadística con una  $P < 0.05$ .

En particular, C10-HL en concentraciones de 12 a 48  $\mu\text{M}$  se promueve el desarrollo de los pelos radiculares cercanos al ápice de la raíz primaria (Fig. 13k-n), mientras que en concentraciones mayores estimula la formación de raíces laterales en la misma zona de la raíz (Fig. 13o). Por otra parte, la C12-HL estimula la formación y crecimiento en concentraciones desde 48 a 196  $\mu\text{M}$  (Fig. 13p-t), y en las concentraciones más altas evaluadas puede observarse la formación de pelos radiculares muy cercanos al ápice de la raíz primaria (Fig. 13t). Los efectos de C14-HL sobre el desarrollo de pelos radiculares fueron similares a los observados en las AHLs de cadena corta (Fig. 13u-y). Considerando que la C10 y C12-HL mostraron los efectos más claros en la promoción sobre el desarrollo de pelos radiculares, se destaca la importancia de la longitud de la cadena del ácido graso para la actividad biológica de las AHLs también para este marcador morfo genético.

Para investigar con mayor detalle los efectos de C10-HL en el desarrollo de los pelos radiculares, se realizaron mediciones de la longitud de los tricoblastos y la longitud de los pelos radiculares de plantas de *Arabidopsis* de 6 d de edad sujetas a diferentes concentraciones de este compuesto. Los tricoblastos son células de la epidermis que dan lugar a los pelos radiculares formando filas de células a lo largo de la superficie de la raíz. Se encontró que la longitud de los tricoblastos disminuye de una manera dosis-dependiente en respuesta al tratamiento con C10-HL (Fig. 14a), mientras que la longitud de los pelos significativamente incrementa con los tratamientos de C10-HL (Fig. 14b). La mayor estimulación de C10-HL sobre el crecimiento de los pelos radiculares se observó en concentraciones mayores a 24  $\mu\text{M}$ , con un incremento de dos veces la longitud de los pelos radiculares comparado con las plantas control que solo son tratadas con el solvente (Fig. 14b). Estos resultados sugieren que AHLs de cadena media alteran el desarrollo de pelos radiculares y que C10-HL incrementa la densidad y crecimiento de los pelos radiculares.



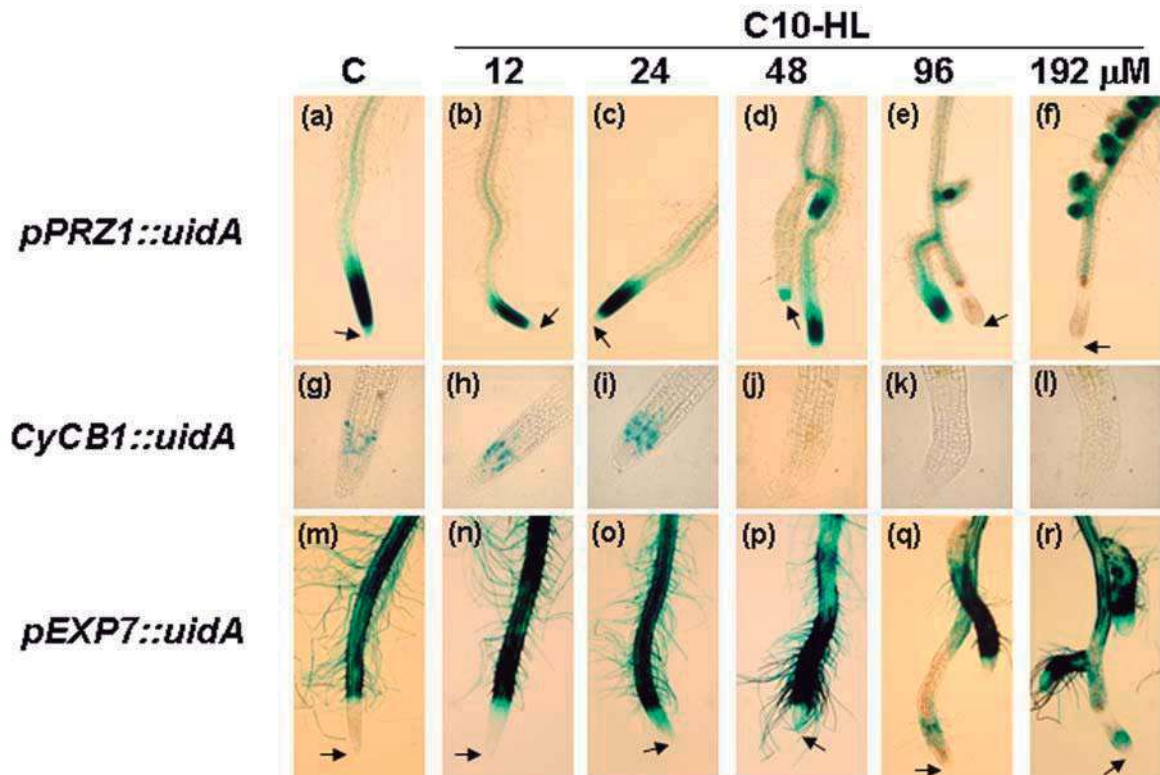
**Figura 13. Efecto de las AHLs en el desarrollo de los pelos radiculares.** Fotografías representativas de pelos radiculares formados en la región del ápice de la raíz primaria de plantas de *Arabidopsis* de 9 días de edad crecidas en la presencia de los compuestos indicados. La flecha indica el ápice del meristemo de la raíz primaria.



**Figura 14. Efectos de la C10-HL sobre la diferenciación de células epidérmicas. (a)** Longitud de tricoblastos y **(b)** Longitud de pelos radiculares. Plantas de *Arabidopsis thaliana* fueron crecidas por 8 d en medio MS 0.2x suplementados con la concentración indicada de C10-HL. Los datos indican la media  $\pm$  desviación estándar. ( $n=20$ ). Este experimento fue repetido dos veces con resultados similares. Las letras distintas muestran una diferencia estadística con una  $P < 0.05$ .

### 7.5. La C10-HL afecta la división y diferenciación celular en raíces de *Arabidopsis*.

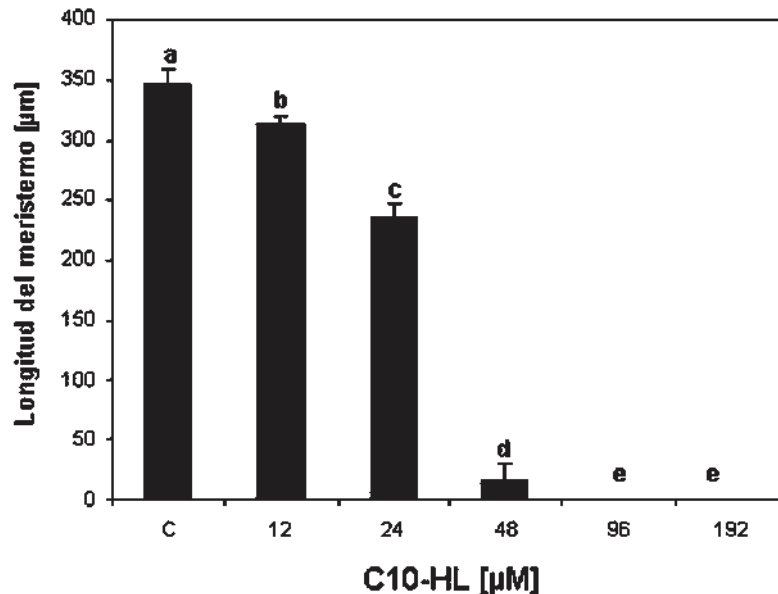
Los efectos del desarrollo post-embionario de AHLs de cadena media en plantas de *Arabidopsis* sugieren que estos compuestos pueden jugar un papel importante en la división celular. Para investigar los cambios que ocurren en la división celular en respuesta a AHLs se establecieron tratamientos con C10-HL y se analizó la expresión del marcador de meristemas *pPRZ1:uidA*, el cual se expresa exclusivamente en tejidos proliferativos (Sieberer *et al.*, 2003) y del marcador de división celular *CyCB1:uidA*, el cual se expresa solamente en células en la fase G2/M del ciclo celular (Cólón-Carmona *et al.*, 1999). Adicionalmente, para evaluar los efectos de C10-HL sobre la diferenciación celular, se utilizó el marcador *pAtEXP7:uidA*, cuya expresión se correlaciona fuertemente con la iniciación del desarrollo de los pelos radiculares (Cho & Cosgrove, 2002). Encontramos que la inhibición del crecimiento de la raíz primaria en concentraciones de 48  $\mu$ M o mayores de C10-HL se correlaciona con la pérdida de la expresión de GUS en el meristemo de las plantas transgénicas que expresan *pPRZ1:uidA* (Fig. 15a-f, flechas) y con la disminución de la división celular en las raíces de plantas de *CyCB1:uidA* (Fig. 15g-l). Estos efectos están acompañados por un programa acelerado de diferenciación celular revelado por la expresión de *AtEXP7:uidA* y la formación de pelos radiculares cercanos al ápice de la raíz en concentraciones desde 24 a 48  $\mu$ M y la formación de raíces laterales cercanas al ápice de la raíz en concentraciones de 96 y 192  $\mu$ M de este compuesto (Fig. 15m-r). La medición de la longitud de la zona de expresión de *pPRZ1:uidA* en tratamientos con C10-HL muestra claramente una inhibición dosis dependiente en el tamaño del meristemo, en el que concentraciones mayores de 48  $\mu$ M afectan dramáticamente la región de expresión de GUS de *pPRZ1:uidA* (Fig. 16). Estos resultados indican que la C10-HL inhibe el crecimiento de la raíz primaria afectando la división celular en el meristemo y acelerando procesos de diferenciación hacia el ápice de la raíz.



**Figura 15. Efecto de la C10-HL sobre la expresión de marcadores de división y diferenciación celular.** Plantas de *Arabidopsis thaliana* *pPRZ:uidA*, *CyCB1:uidA* y *pAtEXP:uidA* fueron crecidas por 10 d en medio MS 0.2x suplementado con la concentración indicada de C10-HL. Las plantas se procesaron para determinar la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa y se clarificaron para mostrar la expresión del gen. Las fotografías son representativas de al menos 15 plantas teñidas. Las flechas son utilizadas para indicar el ápice de la raíz primaria.

### 7.6. El efecto de la C10-HL sobre el desarrollo de la raíz es independiente de la señalización por auxinas.

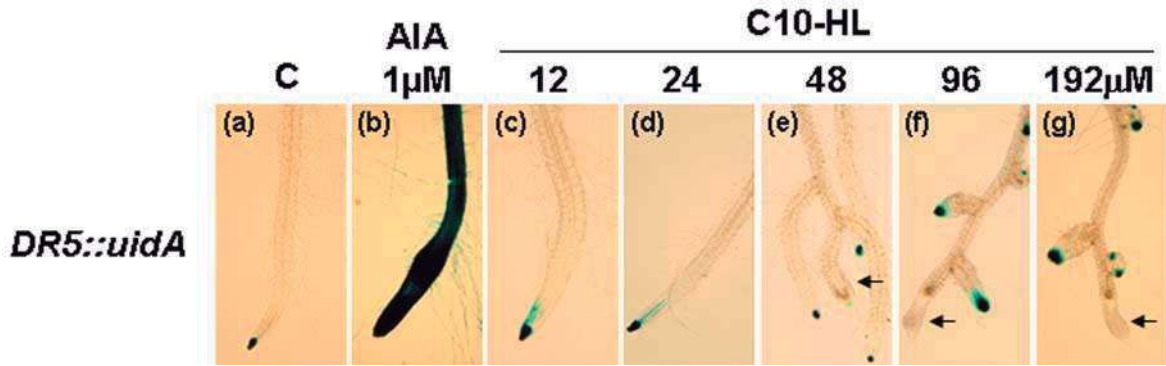
Los efectos de C10-HL sobre la arquitectura de la raíz son similares a los producidos por las auxinas cuando se aplican al medio de crecimiento de *Arabidopsis*. En general, las raíces son más cortas, los pelos radiculares aumentan en densidad y tamaño y se estimula la formación de raíces. Para determinar si los efectos de la C10-HL puede o no funcionar vía un proceso regulado por auxinas, se analizó la expresión del marcador inducible por auxinas *DR5:uidA* en respuesta a tratamientos con C10-HL. En la figura 17 se muestra la actividad histoquímica de GUS en raíces de plantas transgénicas que expresan *DR5:uidA* que fueron crecidas por 10 d en medios suplementados con el solvente, con el ácido indol acético (AIA), que es una auxina natural o con C10-HL.



**Figura 16. Efecto de la C10-HL sobre la longitud del meristemo.** Plantas de *Arabidopsis thaliana pPRZ1:uidA* fueron crecidas por 10 d en medio MS 0.2x suplementado con la concentración indicada de C10-HL. Las plantas fueron procesadas para determinar la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa y clarificadas para mostrar la expresión del gen. La zona de expresión del marcador fue medida con un micrómetro. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar. ( $n=30$ ).

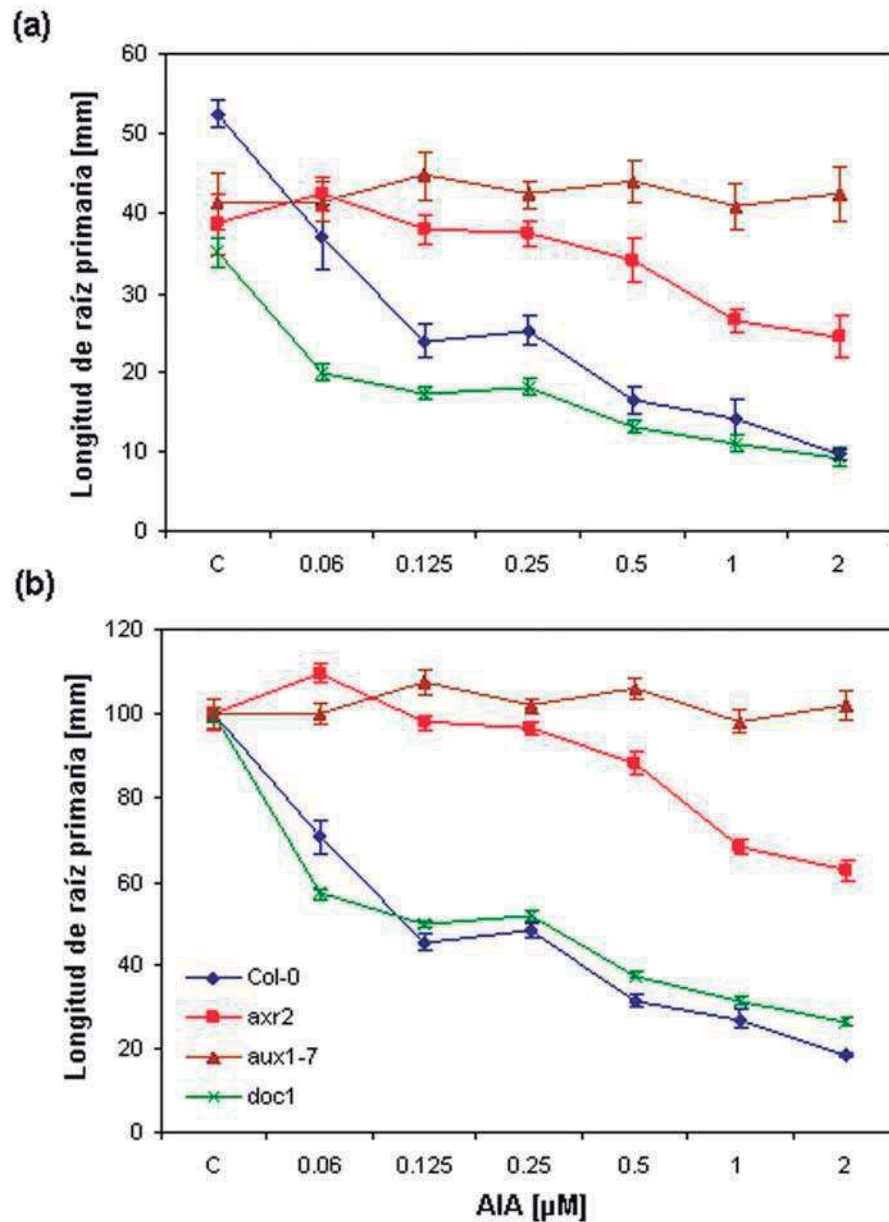
En plantas control tratadas con el solvente, la expresión de *DR5:uidA* se encuentra localizada principalmente en la columnela y centro quiescente del ápice de la raíz (Fig. 17a). En plantas crecidas en una concentración de 1  $\mu$ M de AIA se presenta una actividad de GUS en toda la raíz primaria (Fig. 17b). Por el contrario, el patrón de expresión de GUS en plantas tratadas con hasta 192  $\mu$ M de C10-HL permanece similar al control (Fig.17c,d) o incluso disminuye (Fig.17e-g, flechas). Estos resultados sugieren que la C10-HL no induce la expresión de genes de respuesta a auxinas en plantas de *Arabidopsis*.

Se han identificado varias mutantes afectadas en la respuesta a auxinas mediante la búsqueda de resistencia a cantidades inhibitorias del crecimiento de la raíz por el tratamiento con estos compuestos.

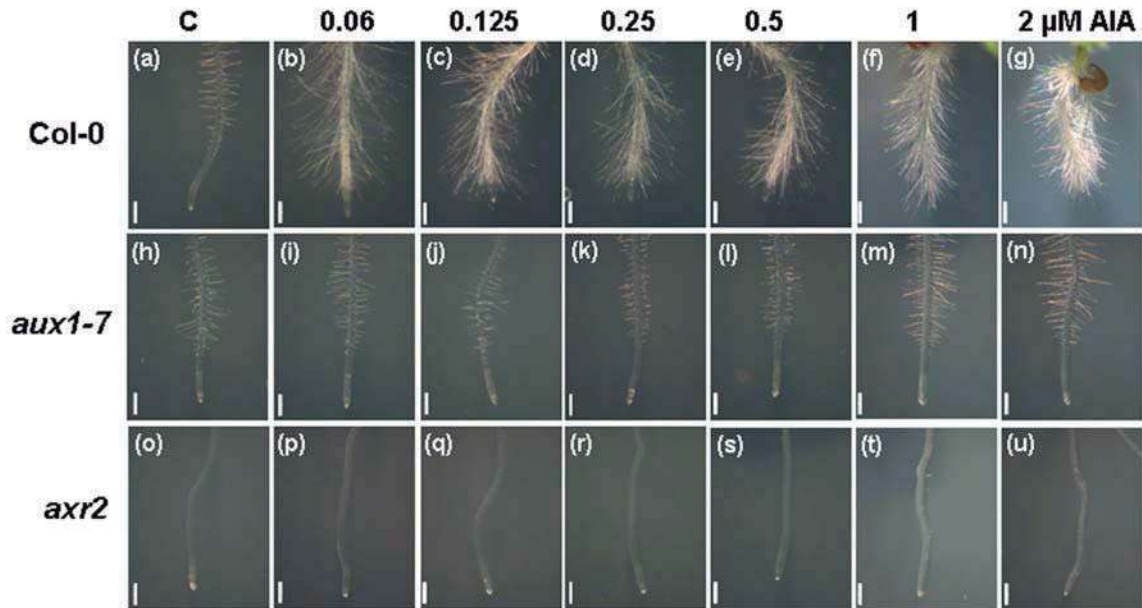


**Figura 17. Efecto de la C10-HL sobre la expresión de genes regulados por auxinas.** (a) Raíces primarias de plantas control que expresan el marcador *DR5::uidA* crecidas por 10 d en medio MS 0.2x y procesadas para la tinción de  $\beta$ -glucuronidasa. (b) Plantas tratadas con 1  $\mu$ M de AIA; (c-g) o con la concentración indicada de C10-HL. Las fotografías son representativas de al menos 20 plantas analizadas. El experimento fue repetido tres veces con resultados similares. Las flechas indican el ápice de la raíz primaria.

Para determinar si la C10-HL interactúa con la ruta auxínica, se estudio el efecto del suministro de AIA o C10-HL al medio de crecimiento de plantas silvestres de *Arabidopsis* (Col-0) y de mutantes insensibles a auxinas *aux1-7*, *axr2* y *doc1* sobre el crecimiento de la raíz primaria. Primeramente, para confirmar la insensibilidad a auxinas de estas mutantes, se analizó el crecimiento de la raíz en respuesta a AIA. En estos experimentos, *aux1-7* y *axr2* fueron resistentes a la inhibición del crecimiento de la raíz primaria por AIA comparado con las plantas silvestres (Fig. 18). Estas mutantes también muestran defectos en la formación de pelos radiculares en la región del ápice de la raíz en respuesta al incremento de la concentración de AIA en el medio, un fenotipo asociado con la resistencia a auxina (Fig. 19). Posteriormente, se evaluaron los efectos de la C10-HL en concentración de 48  $\mu$ M sobre el crecimiento de la raíz primaria y densidad de raíces laterales (raíces laterales emergidas por centímetro de raíz primaria) en plantas silvestres y en las mutantes *aux1-7*, *doc1* y *axr2*. En el tratamiento control la mutante *doc1* muestra un crecimiento reducido de la raíz primaria, mientras que *aux1-7* y *axr2* un incremento respecto a las plantas silvestres aunque no significativamente estadístico en el crecimiento de la raíz primaria (Fig. 20a).

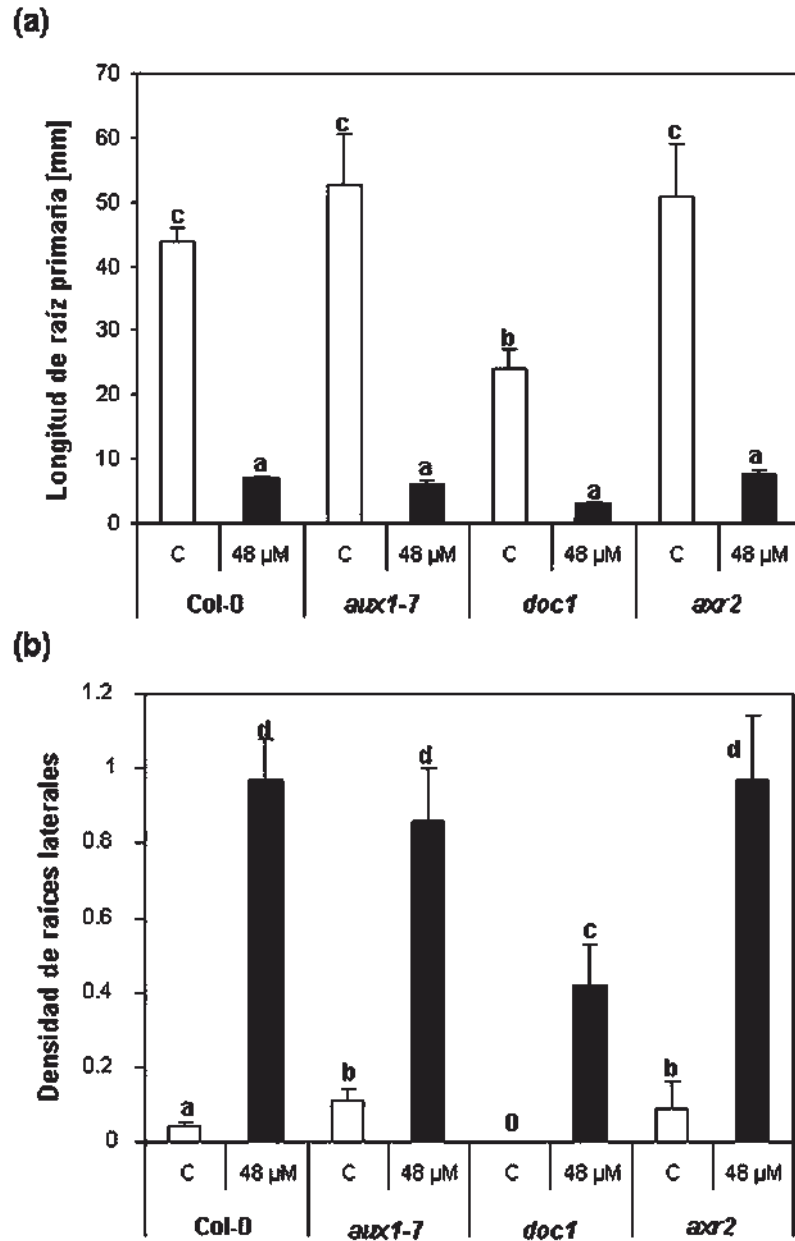


**Figura 18. Efecto del AIA en el crecimiento de la raíz primaria de plantas silvestres de *Arabidopsis* (Col-0) y mutantes insensibles a auxinas.** Plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* y las mutantes *aux1-7*, *doc1* y *axr2* fueron crecidas durante 8 d en medio MS 0.2x suplementado con la concentración indicada de AIA. Los valores mostrados representan la media de la longitud de la raíz primaria (a) y el crecimiento relativo (%) de la raíz primaria (b) de 30 plantas  $\pm$  desviación estándar. El experimento fue repetido dos veces con resultados similares.



**Figura 19.** Morfología de los ápices de la raíz de plantas silvestres de *Arabidopsis* (Col-0) y de las mutantes *aux1-7* y *axr2* insensibles a auxinas tratadas con concentraciones crecientes de AIA. Las plantas fueron crecidas por 7 d y fotografiadas utilizando un microscopio. La barra de escala representa 400  $\mu\text{m}$ .

A pesar de estas diferencias, el crecimiento de la raíz primaria de *aux1-7*, *doc1* y *axr2* en el medio con 48  $\mu\text{M}$  de C10-HL causó una inhibición del 90 % muy similar al observado en plantas tipo silvestres (Fig. 20a). La densidad de raíces laterales se incrementa en plantas silvestres Col-0, y de manera similar en las mutantes *aux1-7*, *doc1* y *axr2* (Fig. 20b). En *doc1* aunque con una menor formación de raíces laterales en el tratamiento control, también proliferan las raíces laterales en respuesta a C10-HL (Fig. 20b). Debido a que C10-HL no induce la expresión de genes regulados por auxinas y que las mutantes *aux1-7*, *doc1* y *axr2* insensibles a auxinas mostraron respuestas similares a las plantas silvestres en el tratamiento con C10-HL, se puede concluir que las auxinas no están involucradas en la respuesta de *Arabidopsis* a C10-HL.



**Figura 20. Efectos de la C10-HL en el crecimiento de la raíz primaria y formación de raíces laterales en mutantes insensibles a auxinas.** Plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* y las mutantes *aux1-7*, *doc1* y *axr2* fueron crecidas por 8 d en medio MS 0.2x suplementado con la concentración indicada de C10-HL. Los valores mostrados representan el promedio de la longitud de la raíz primaria (a) y la densidad de raíces laterales (b) de 30 plantas  $\pm$  desviación estándar. Las distintas letras indican diferencias estadísticas con una  $P < 0.05$ . El experimento fue repetido tres veces con resultados similares.

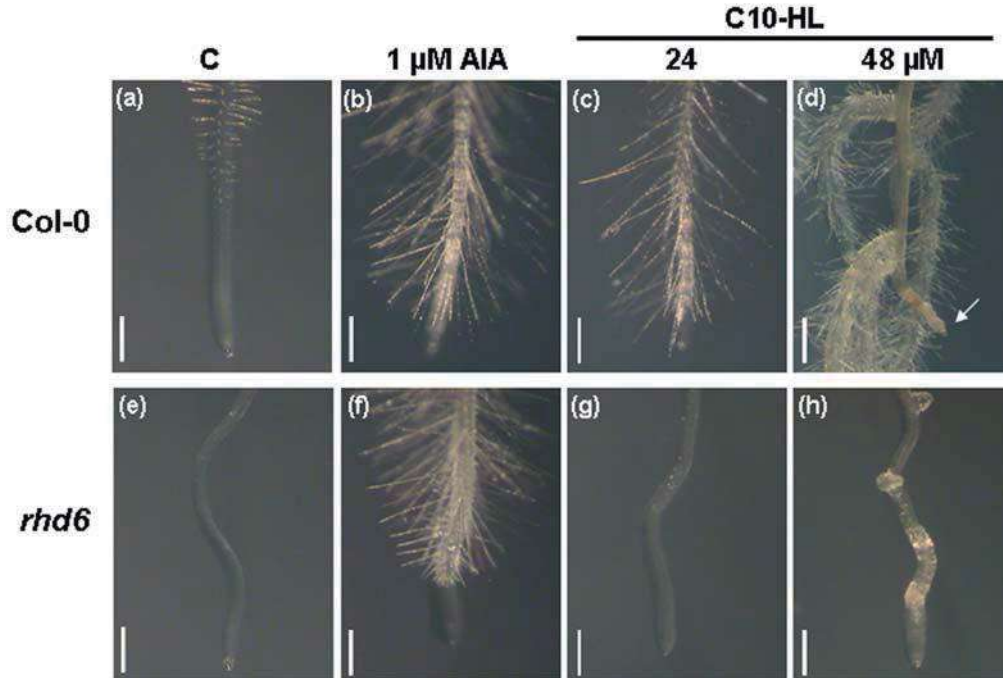
### **7.7. Efecto de la C10-HL en la formación de pelos radiculares en la mutante *rhd6* de *Arabidopsis*.**

Las auxinas son importantes para la formación de pelos radiculares como lo demuestran diferentes mutantes insensibles a auxinas que tienen alterada la formación de estas estructuras (Parker *et al.*, 2000). De interés particular es la mutante *rhd6*, la cual está afectada en la iniciación de pelos radiculares y sólo se rescata con la aplicación de auxinas (Masucci & Schiefelbein, 1994). Se utilizó la mutante *rhd6* como una herramienta para probar el posible mecanismo de acción de C10-HL. Se compararon las respuestas de plantas de *Arabidopsis* tipo silvestre y mutante *rhd6* con AIA y C10-HL a los 7 d.d.g en su capacidad para inducir la formación de pelos radiculares en la mutante. En la figura 21 se observa que el tratamiento con 1  $\mu$ M de AIA estimula la elongación e incremento en la formación de pelos radiculares en la región cercana al ápice de la raíz en plantas silvestres de *Arabidopsis* (Fig. 21a,b). Un efecto similar ocurrió al tratar estas plantas con 24  $\mu$ M de C10-HL (Fig. 21c), mientras que una concentración de 48  $\mu$ M de este compuesto da lugar a la formación de raíces laterales (Fig. 21d). Las mutante *rhd6* crecidas en medio sin auxinas estaban completamente carentes de pelos radiculares (Fig. 21e). Como previamente había sido reportado (Masucci & Schiefelbein, 1994), se encontró que el AIA induce la formación de pelos radiculares en *rhd6* (Fig. 21f), en tanto que los tratamientos con 24 o 48  $\mu$ M de C10-HL no inducen la formación de pelos radiculares en *rhd6* (Fig. 21g,h). Estos resultados indican que la C10-HL no puede restaurar la formación de pelos radiculares en *rhd6*, demostrando un mecanismo de acción independiente de auxinas de este compuesto en la planta.

### **7.8. Participación de la amido hidrolasa de ácidos grasos de *Arabidopsis* en la respuesta de la raíz a la C10-HL.**

Recientemente se identificó una enzima de la familia de las amido hidrolasas de ácidos grasos (FAAH) que hidroliza NAEs, moléculas

estructuralmente relacionadas con las AHLs y alcanidas (Para la estructura de NAE 10:0, ver Fig. 8) (Wang *et al.* 2006).



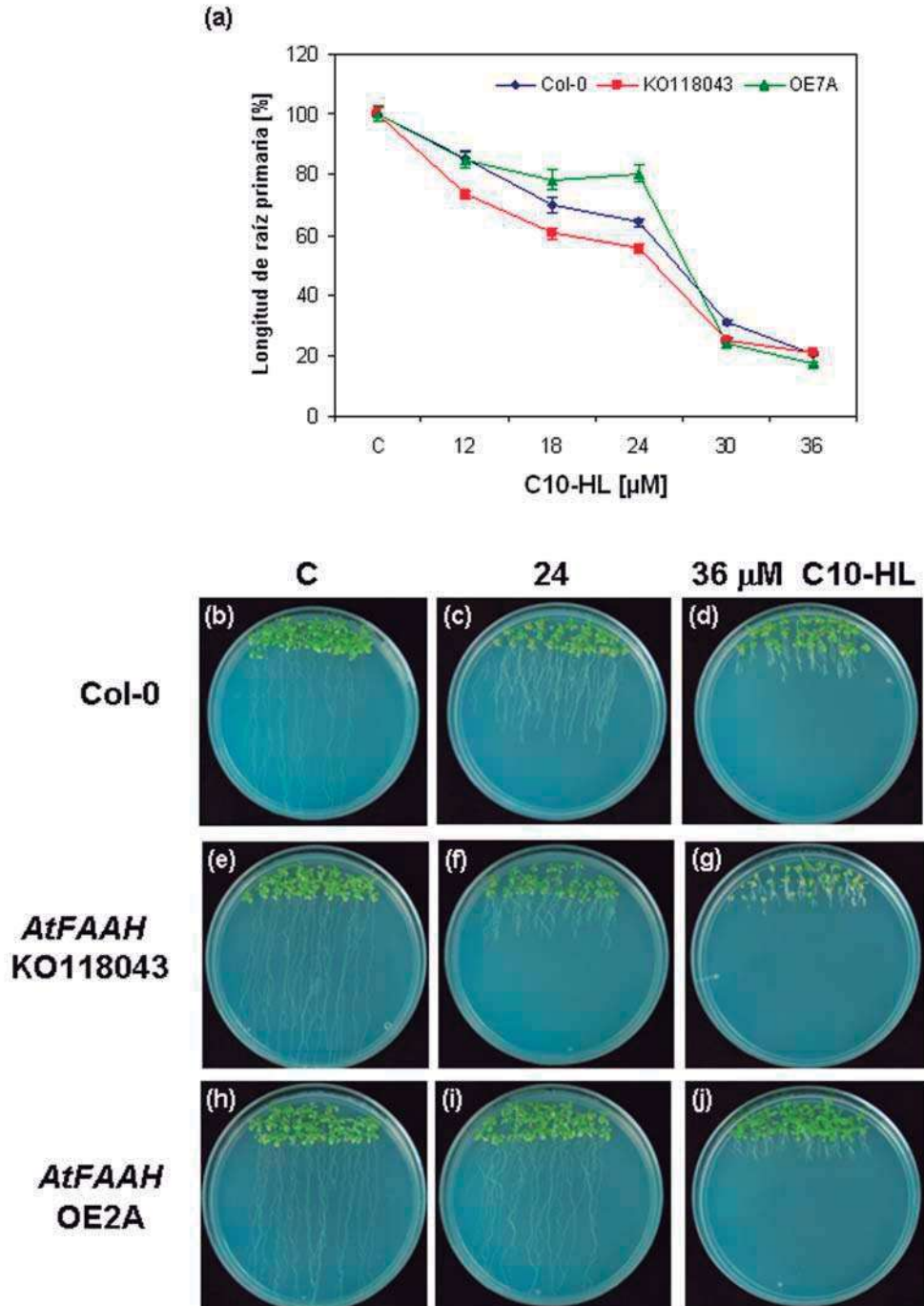
**Figura 21. Efectos del AIA y C10-HL en la formación de pelos radiculares en la mutante *rhd6* de *Arabidopsis*.** (a) Raíz silvestre de *A. thaliana* (Col-0) con la formación normal de pelos radiculares. (b-d) Formación de pelos radiculares en respuesta a tratamiento con AIA o C10-HL. (e) Una raíz típica de *rhd6* mostrando una reducción en la formación de pelos radiculares. (f-h) Formación de pelos radiculares en raíces de *rhd6* en respuesta a tratamiento con AIA o C10-HL. Las barras de escala representan 400  $\mu$ m. La flecha indica el ápice de la raíz primaria.

Para investigar si AtFAAH puede jugar un papel en el metabolismo *in vivo* de AHLs, se analizó el crecimiento de plantas mutantes *AtFAAH* y sobreexpresantes de esta enzima en líneas previamente reportadas por Wang *et al.* (2006), en respuesta a C10-HL. Las plantas sobreexpresantes de *AtFAAH* (OE2A) fueron más resistentes a la inhibición del crecimiento de la raíz primaria, mientras que las mutantes (*faah*, KO118043) fueron hipersensibles a C10-HL (Fig. 22a). La sensibilidad diferencial de las líneas sobreexpresantes y mutantes se evidencia al comparar el desarrollo general de la planta, en las que las líneas sobreexpresantes de la *AtFAAH* muestran un crecimiento sostenido de la raíz y del follaje en concentraciones inhibitorias de C10-HL, mientras que las mutantes

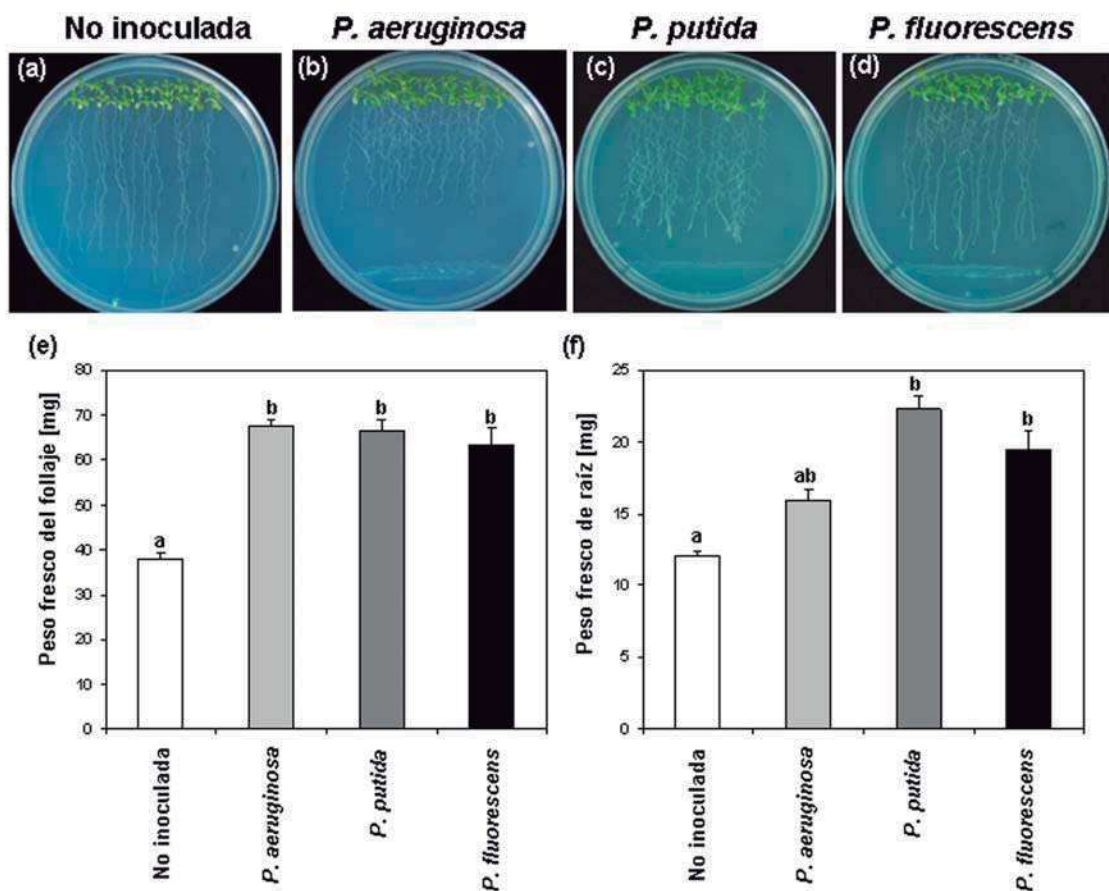
*faah* mostraron mayor sensibilidad que las plantas silvestres (Col-0) y las sobreexpresantes (Fig. 22b-j). Estos resultados sugieren que la alteración en la expresión de *AtFAAH* altera las respuestas de la planta a una AHL altamente activa.

### **7.9. Estimulación del crecimiento en *Arabidopsis* por rizobacterias del género *Pseudomonas*.**

La señalización vía AHLs podría estar implicada en las interacciones planta-bacteria. Para evaluar los efectos de la inoculación con cepas de rizobacterias productoras de AHL en el crecimiento de la planta, se inocularon plantas de *Arabidopsis thaliana* de 5 d de edad crecidas en medio MS 0.2x con aproximadamente  $2.8 \times 10^8$  unidades formadoras de colonia (UFC) de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* mediante un estriado del inóculo bacteriano sobre el medio a una distancia de 5 cm del ápice de la raíz primaria. Utilizando un sistema similar de interacción planta-bacteria ha sido posible estudiar los efectos de compuestos bacterianos difusibles en el crecimiento de las plantas sin un contacto directo entre la planta y la bacteria (López-Bucio *et al.*, 2007a). Después de 8 días después de la inoculación (d.d.i.) de crecimiento en la presencia de *P. aeruginosa*, *P. putida* y *P. fluorescens*, se observó un incremento significativo en la producción de biomasa de follaje y raíz (Fig. 23a-f). Además, se observó que la inoculación con cada una de las tres bacterias alteró la arquitectura del sistema radicular de *Arabidopsis* mediante la inhibición del crecimiento de la raíz y la estimulación en la formación de raíces laterales (Fig. 24a-d). *P. aeruginosa* fue la especie bacteriana que inhibió de manera más notable el crecimiento de la raíz e incrementó la densidad y longitud de las raíces laterales. La promoción del crecimiento y las alteraciones en la arquitectura de la raíz observadas en las plantas inoculadas con *P. aeruginosa*, *P. putida* y *P. fluorescens* muestran efectos similares a los plantas de *Arabidopsis* tratadas con AHLs, lo cual sugiere un mecanismo común para la estimulación del crecimiento vegetal por las tres rizobacterias.



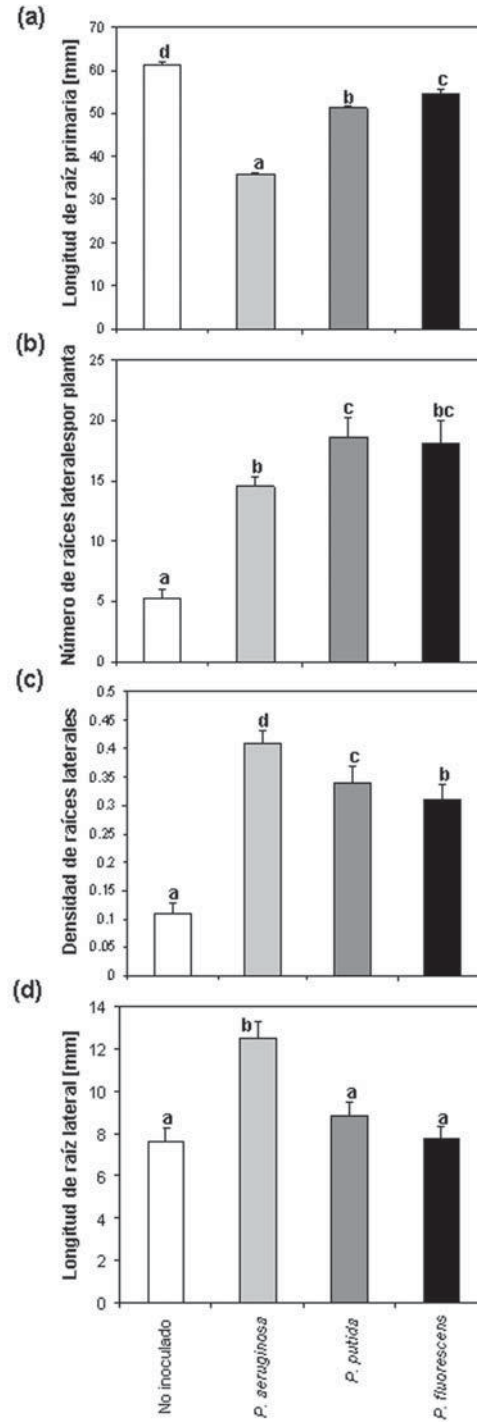
**Figura 22. Efecto de la C10-HL sobre el crecimiento de líneas mutantes y sobreexpresantes de la amido hidrolasa de ácidos grasos de *Arabidopsis*.** Plantas silvestres Col-0, mutantes (KO118043) y sobreexpresantes (OE2A) de la amidohidrolasa de ácidos grasos de *Arabidopsis* (*AtFAAH*) se crecieron en medio MS 0.2x o con diferentes tratamientos de C10-HL durante 10 d. (a) Longitud de la raíz primaria. (b-j) Morfología general de las plantas. Se presentan fotografías representativas de tres placas independientes. Los valores mostrados representan la media  $\pm$  desviación estándar. El experimento se repitió tres veces con resultados similares.



**Figura 23.** Estimulación del crecimiento de plantas de *Arabidopsis* por bacterias del género *Pseudomonas*. Las Plantas de *Arabidopsis* (Col-0) fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2x por 5 d. Posteriormente las plantas fueron inoculadas mediante un estriado de la cepa bacteriana correspondiente y crecidas por 8 días adicionales. **(a-d)**. Morfología de las plantas, **(e)**. Peso fresco de follaje. **(f)**. Peso fresco de raíz. Las fotografías son representativas de al menos tres placas independientes. Los valores gráficos muestran la media  $\pm$  desviación estándar de 60 plantas analizadas. Las diferentes letras indican las diferencias estadísticas con una  $P < 0.05$ . El experimento fue repetido tres veces con similares resultados.

### 7.10. La mutación de los genes *lasI* y *rhII* potencia el efecto promotor del crecimiento de *A. thaliana* por *P. aeruginosa*.

*Pseudomonas aeruginosa* tiene dos sistemas de QS, los sistemas *lasI* y *rhII*; en el sistema *lasI* la sintasa AHL dirige la síntesis de 3-oxo-C12-HL, la cual interacciona con el receptor LasR y activa los promotores de genes regulados por este compuesto. En el sistema *rhII*, la sintasa *rhII* dirige la síntesis de C4-HL, la cual interacciona con el regulador RhIR y activa la transcripción de genes blanco (Pesci *et al.*, 1997, Water & Bassler, 2005).



**Figura 24. Efecto de la inoculación con bacterias del género *Pseudomonas* en la arquitectura del sistema radicular de *Arabidopsis*.** Las plantas de *Arabidopsis* (Col-0) de 5 d de edad fueron inoculadas con tres especies diferentes de *Pseudomonas* y crecidas por 8 días adicionales en presencia de la bacteria. Los datos muestran la media de la raíz primaria (a), número de raíces laterales (b), densidad de raíces laterales (c) y longitud de raíces laterales (d)  $\pm$  desviación estándar (n=30). Las diferentes letras indican las diferencias estadísticas con una  $P < 0.05$ . Los experimentos fueron repetidos tres veces con resultados similares.

Para evaluar el papel de cada una de las sintasas de los sistema de QS en *P. aeruginosa*, se comparó el efecto de la inoculación con *P. aeruginosa* PAO1 y las mutantes de *P. aeruginosa* deficientes en las sintasas *lasI*, *rhII* y una doble mutante *rhII/lasI* en el crecimiento de plantas de *Arabidopsis*.

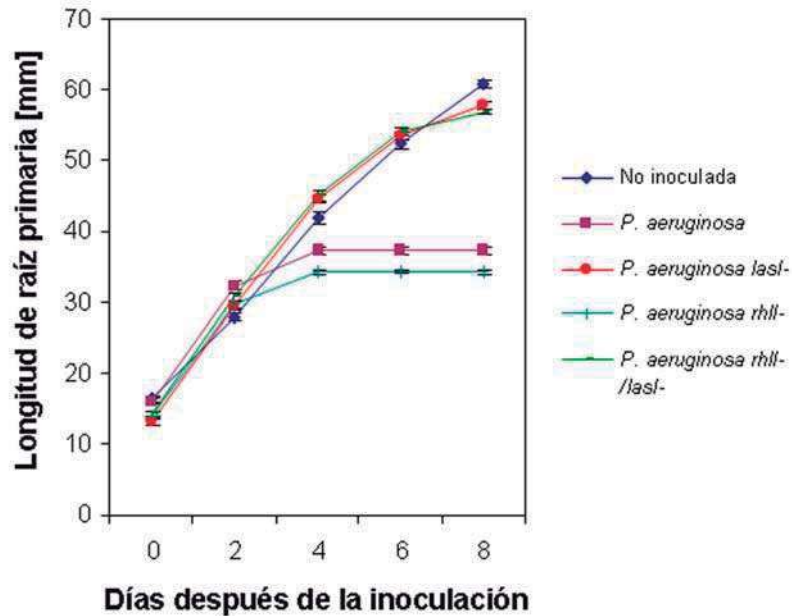
Durante los primeros 3 días después de la inoculación, el crecimiento de las raíces primarias de plantas de *Arabidopsis* no inoculadas e inoculadas denota un crecimiento muy similar (Fig. 25). Sin embargo, a los 4 días, se observó una reducción gradual del crecimiento de la raíz primaria de plantas inoculadas con *P. aeruginosa* PAO1 y en la mutante *rhII* comparado con las plantas no inoculadas. Resultó interesante que las plantas no inoculadas o inoculadas con *P. aeruginosa lasI*- o la mutante doble *rhII-lasI*- manifiestan una tasa constante de crecimiento (Fig. 25).

Aunque de la inoculación con las cepas mutantes en la sintasa *lasI* restaura el crecimiento de la raíz primaria, el efecto promotor del crecimiento vegetal no se pierde, al contrario se incrementa. La figura 26 muestra la cuantificación de biomasa de la raíz y del follaje de las plantas control e inoculadas con las diferentes cepas. Se observa que el desarrollo general se estimula, destacándose en particular la ramificación prolífica de la raíz en placas inoculadas con las mutantes *lasI*- (Fig. 26a-e). Esto también se reflejó en un efecto sinérgico en el peso fresco de la raíz y del follaje por efecto de la mutación en *lasI-rhII*- (Fig. 26f-g). Estos resultados sugieren que *P. aeruginosa* promueve el crecimiento vegetal en *A. thaliana* y que las sintasas de AHL desempeñan un papel importante en este proceso.

#### **7.11. La modulación del crecimiento de la raíz por la inoculación de *P. aeruginosa* involucra cambios en la división celular a través de un mecanismo mediado por la AHL sintasa *lasI*.**

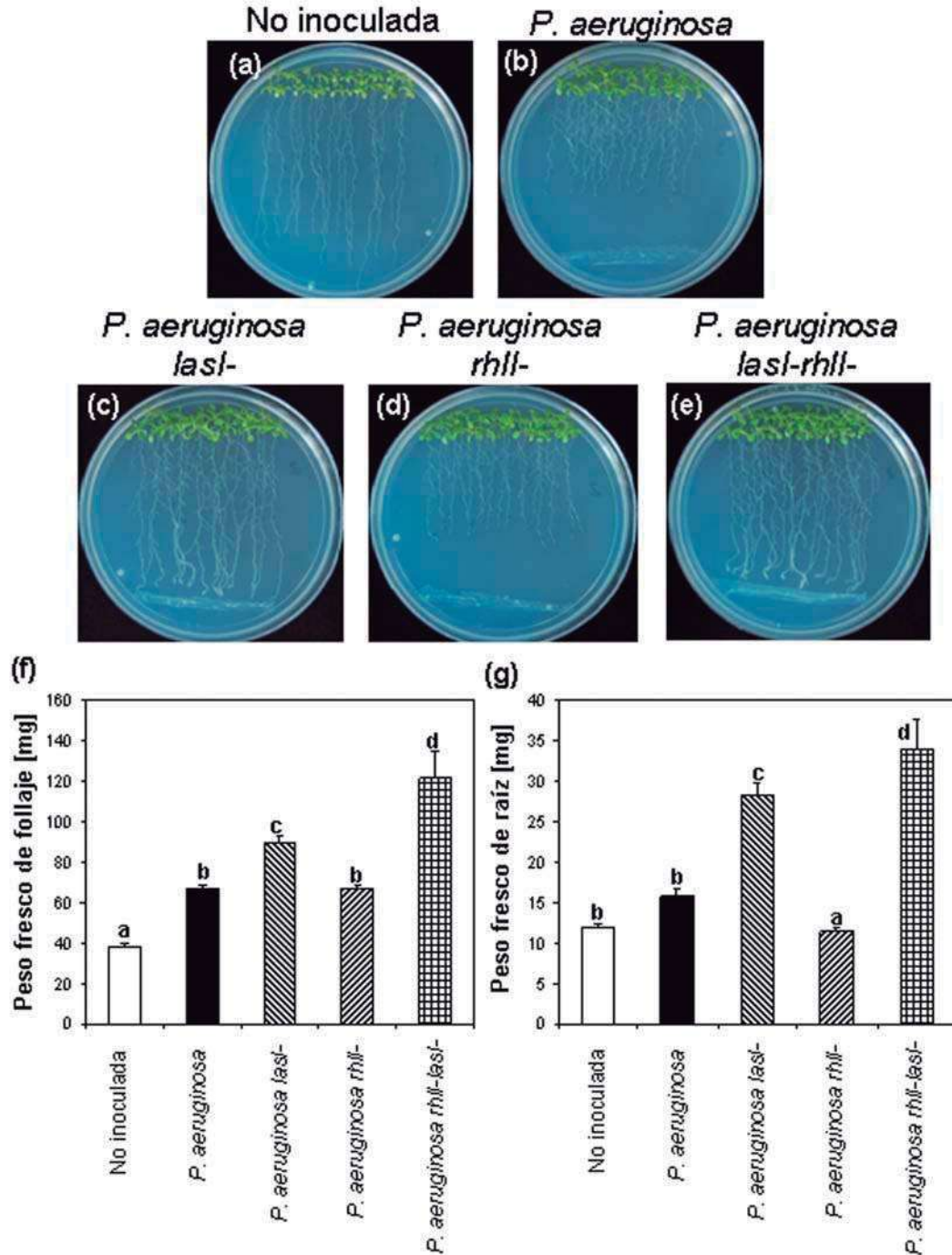
Para entender los fundamentos celulares de los efectos en el crecimiento de la raíz modulado por *P. aeruginosa*, se investigaron las alteraciones en el proceso de división celular en el meristemo de la raíz primaria en respuesta a la

inoculación con la cepa silvestre de *P. aeruginosa* PAO1 y las mutantes en las sintasas de AHLs *lasI*- y *rhlI*- mediante el análisis de la expresión de los marcadores *CyCB1:uidA* y *pPRZ1:uidA*.



**Figura 25.** Efecto de la inoculación con *P. aeruginosa* PAO1 y mutantes en las AHL sintasas sobre el crecimiento de la raíz primaria en plantas de *Arabidopsis*. Las plantas de *Arabidopsis* de 5 d de edad fueron inoculadas con las cepas de *P. aeruginosa* indicadas y crecidas por 8 d en medio MS 0.2x. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar ( $n=30$ ). El experimento fue repetido tres veces con resultados similares.

Para esto, las plantas transgénicas que expresan cada uno de estos marcadores fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2x por 5 d e inoculadas con las diferentes cepas bacterianas. En plantas no inoculadas, *CyCB1:uidA* y *pPRZ1:uidA* se expresan en el meristemo de la raíz (Fig. 27a,f). La inhibición del crecimiento de la raíz primaria en respuesta a la inoculación con *P. aeruginosa* PAO1 o con la mutante *rhlI*- se correlaciona con la reducción de la expresión de *CyCB1:uidA* (Fig. 27b,d) y *pPRZ1:uidA* (Fig. 27g,i). Interesantemente, las inoculaciones con las mutantes de *P. aeruginosa lasI*- y *rhlI-lasI*- no afectaron la proliferación celular en el meristemo de la raíz como lo revela la expresión normal de los dos marcadores celulares (Fig. 27).

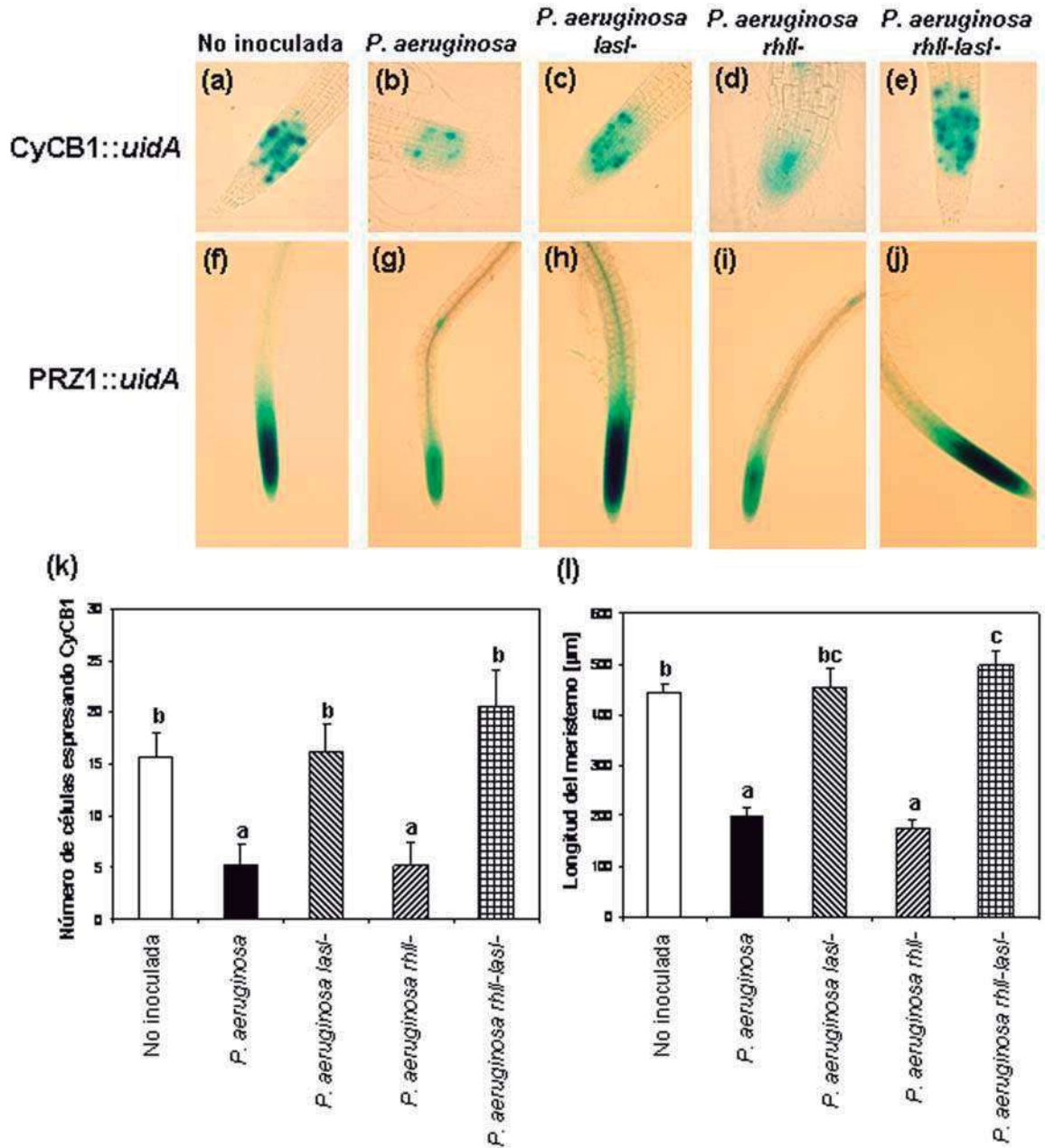


**Figura 26.** Estimulación del crecimiento de *Arabidopsis* por la mutación de las sintasas *LasI* y *RhII* de *P. aeruginosa*. Las plantas de *Arabidopsis* de 5 d de edad fueron inoculadas con *P. aeruginosa* PAO1 y las mutantes *lasI-*, *rhII-* y una doble mutante *rhII-lasI-*. (a-e). Fotografías representativas tomadas de plantas a los 8 d después de la inoculación. (f). Peso fresco de follaje, (g) Peso fresco de raíz. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar ( $n=60$ ). Las diferentes letras indican las diferencias estadísticas con una  $P < 0.05$ . El experimento fue repetido tres veces con resultados similares.

Además, la reducción de la expresión de GUS correlaciona con un número reducido de células expresando *CyCB1:uidA* (Fig. 27k) y con la inhibición en el tamaño del meristemo marcado por la expresión *pPRZ:uidA* (Fig. 27l). Por tanto, la inhibición observada por la inoculación de *P. aeruginosa* en el crecimiento de la raíz primaria se debe, al menos en parte, a la reducción en la proliferación celular en el meristemo en un mecanismo que involucra la producción de AHLs por la AHL sintasa *lasI*.

### **7.12. Identificación de la AHL producida por *P. aeruginosa* responsable de la inhibición del crecimiento de la raíz primaria en *Arabidopsis*.**

El hecho de que la inoculación con *P. aeruginosa* PAO1 inhibe el crecimiento de la raíz primaria mediante un mecanismo regulado por la sintasa *lasI*, nos llevó a la tarea de determinar la identidad química de las AHLs producidas por la bacteria capaces de inhibir el crecimiento radicular. Todas las AHLs producidas por las bacterias Gram negativas tienen un anillo homoserina lactona en su estructura (Kaplan & Greenberg, 1985). Debido a su inherente lipofiliidad, las AHLs fueron extraídas del sobrenadante del cultivo bacteriano con solventes orgánicos como el acetato de etilo. Las diferentes fracciones se obtuvieron de sobrenadantes libres de células de cultivos de *P. aeruginosa* PAO1 en fase estacionaria. Posteriormente, el extracto total de AHLs de *P. aeruginosa* se concentró mediante un sistema de evaporación rotatoria que se analizó posteriormente por HPLC para analizar el perfil y separación de las AHL producidas. Se identificaron 12 fracciones con actividad biológica potencial (Fig. 28a). La actividad de cada fracción se analizó mediante el crecimiento de plantas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) en medio MS 0.2x suplementado con 50  $\mu$ L de cada fracción. La fracción 7, con un alto grado de pureza (Fig. 28b) mostró la mayor actividad biológica inhibiendo el crecimiento de la raíz primaria (Fig. 28c) e incrementando la densidad de raíces laterales por planta (Fig. 28d).

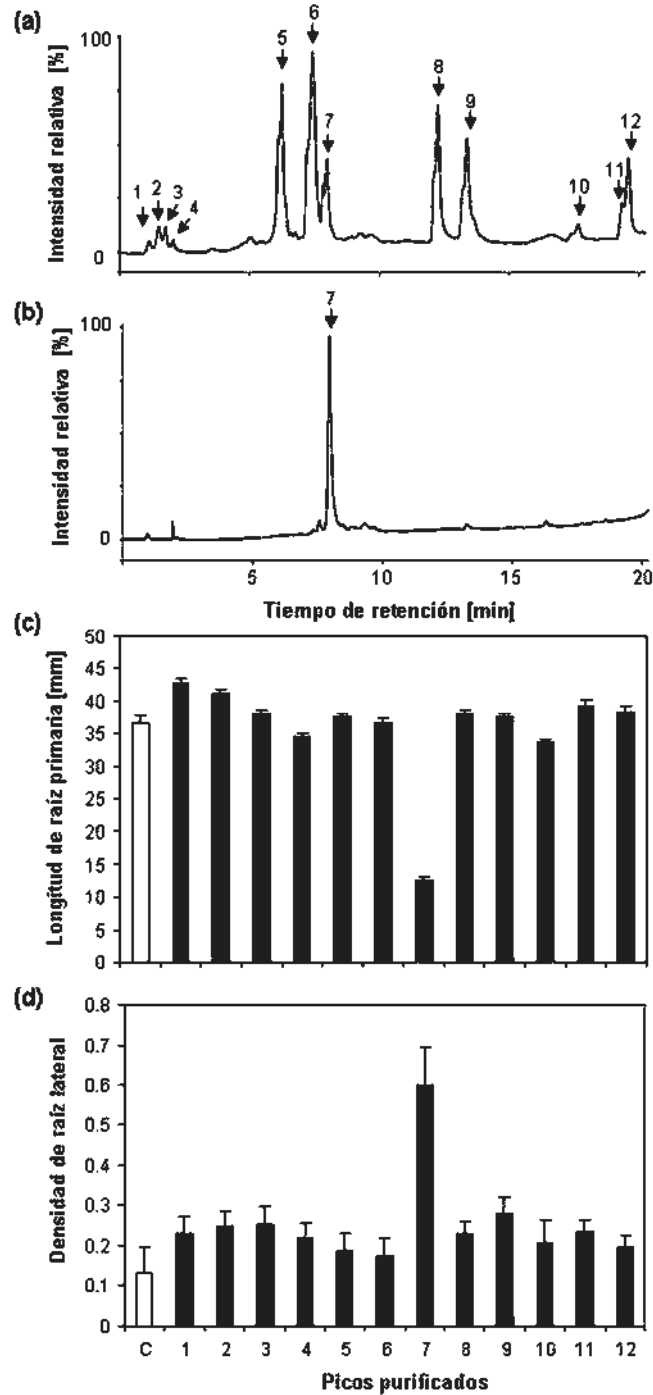


**Figura 27. Modulación en la expresión de genes de división celular en *Arabidopsis* por la inoculación de *P. aeruginosa*.** Las plantas transgénicas que expresan los marcadores de división celular *CyCB1::uidA* (a-e) y *pPRZ1::uidA* (f-j) fueron crecidas en medio MS 0.2x por 5 d, posteriormente fueron inoculadas con las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 y las mutantes de las AHL sintasas *rhil*, *lasl* y *rhil/lasl*. Las plantas fueron teñidas a los 8 d después de la inoculación para determinar la actividad histoquímica de la  $\beta$ -glucuronidasa y clarificadas para mostrar la expresión del gen. Las fotografías son representativas de al menos 15 plantas teñidas. (k) Número de células expresando *CyCB1*, (l) Longitud del meristemo. Los datos muestran la media  $\pm$  desviación estándar ( $n=30$ ). Las diferentes letras indican una diferencia estadística con una  $P < 0.05$ .

Posteriormente, esta fracción se analizó por GC-MS para la identificación química del compuesto. El análisis de GC/MS identifica un solo pico con tiempo de retención de 28.72 con un ión molecular de 244, el cual corresponde a la composición química de *N*-(3-hidroxi-octanoil-homoserina lactona);(*N*- 3-OH-C8-HL) (Fig. 29).

### **7.13. Efecto de la *N*-3-OH-C8-HL aislada de *P. aeruginosa* sobre la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.**

La 3-OH-C8-HL fue purificada y concentrada para evaluar su actividad biológica sobre la arquitectura de la raíz de *A. thaliana*. Las plantas de *A. thaliana* (Col-0) fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2x suplementado con 60  $\mu$ M de 3-OH-C8-HL y se evaluó el crecimiento de la raíz primaria a los 10 d después de la germinación. La 3-OH-C8-HL inhibió el crecimiento de la raíz primaria en un 60 % e incrementó el número de raíces laterales por centímetro de raíz primaria. Además, mostró un efecto en el desarrollo de los pelos radiculares, incrementando el número y longitud de los pelos radiculares cercanos al ápice de la raíz primaria (Fig. 30).



**Figura 28. Identificación de componentes del extracto de *P. aeruginosa* con actividad inhibitoria sobre el crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis*.** El extracto natural conteniendo las diferentes AHLs producidas por *P. aeruginosa* se analizó por HPLC y se colectaron y concentraron las diferentes fracciones (a) Cromatograma del perfil de producción de AHLs. (b) Cromatograma de la fracción con mayor actividad. Los números indican cada una de las fracciones separadas. (c,d) Actividad biológica de cada una de las fracciones sobre la arquitectura de la raíz. Los datos muestran la media  $\pm$  desviación estándar ( $n=30$ ).

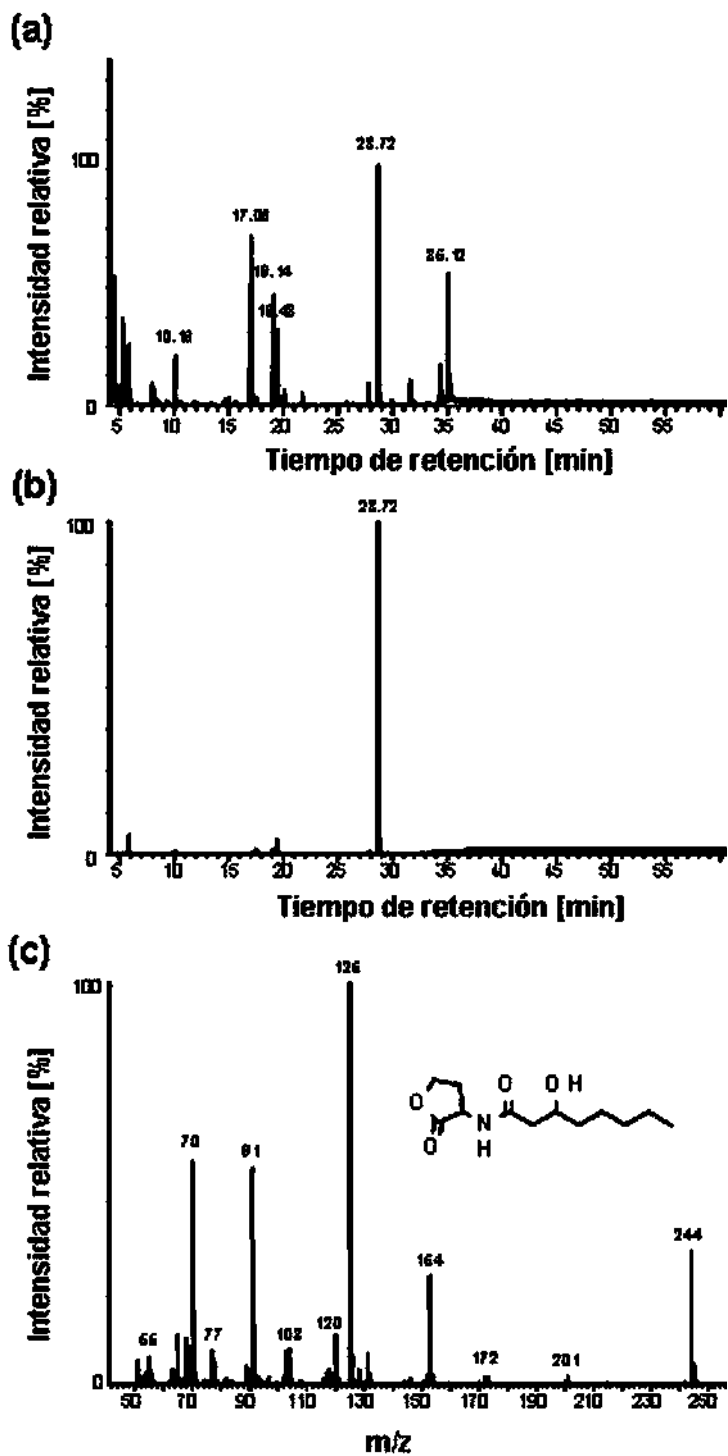
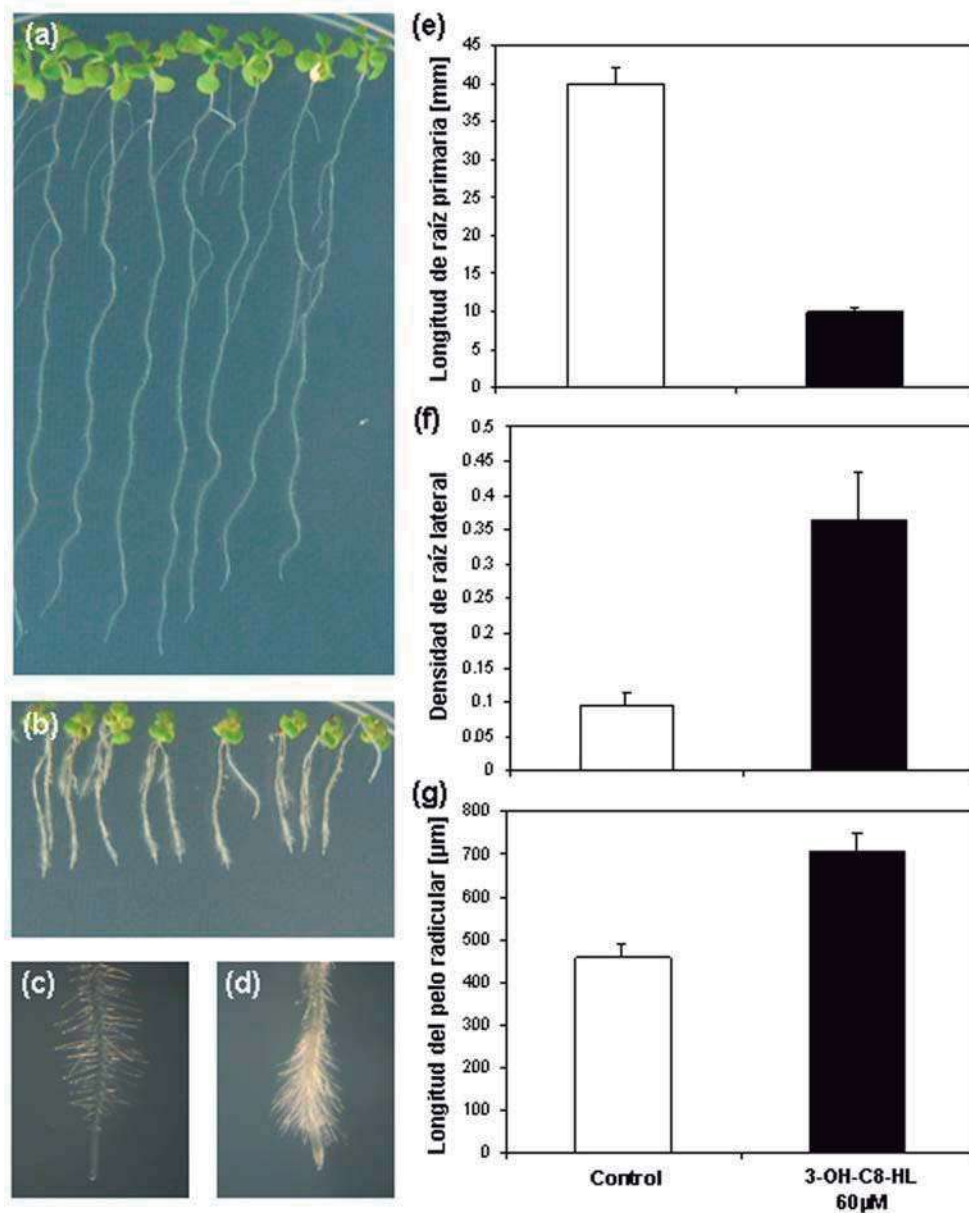


Figura 29. Identificación química del compuesto de *P. aeruginosa* que inhibe el crecimiento de la raíz de *Arabidopsis*. Análisis por GC-MS del extracto de *P. aeruginosa* (a) y la fracción con mayor actividad biológica (b). (c) Análisis de MS de la fracción con actividad biológica con  $m/z$  de 244 correspondiente a la *N*-(3-hidroxi-octanoyl)-homoserina lactona.



**Figura 30.** Efecto de la 3-OH-C8-HL de *P. aeruginosa* sobre la morfología de la raíz de *Arabidopsis*. Las plantas de *Arabidopsis* fueron germinadas y crecidas en medio suplementados con el solvente (a) y 60 μM de 3-OH-C8-HL (b) por 8 d y se comparó el desarrollo de pelos radiculares en plantas control (c) y tratadas con el compuesto (d). También se cuantificó el crecimiento de la raíz primaria (e), la densidad de raíces laterales (f) y la longitud de los pelos radiculares (g). Los datos representan la media ± desviación estándar ( $n=30$ ).

## 8. DISCUSIÓN.

El desarrollo post-embriionario en plantas está regulado por factores ambientales (López-Bucio *et al.*, 2003) y fisiológicos (Kende & Zeevart 1997). Recientemente, las NAEs y alcaloides se han considerado como potenciales reguladores del desarrollo post-embriionario en *Arabidopsis* (Ramírez-Chávez *et al.*, 2004; López-Bucio *et al.*, 2007; Morquecho-Contreras & López-Bucio, 2007; Campos-Cuevas *et al.*, 2008). En este trabajo, se estudió el papel de las AHLs, una clase de moléculas bacterianas relacionadas estructuralmente con los alcaloides y NAEs sobre el desarrollo post-embriionario de la raíz de *Arabidopsis*. Las AHLs son moléculas que participan en la comunicación celular de bacterias Gram negativas en un proceso denominado “quorum-sensing” (QS). El QS primeramente descrito en *Vibrio fischeri*, una bacteria simbiote de organismos abismales que produce una luminiscencia, está regulado por la 3-oxo-hexanoil-HL que se difunde libremente a través de la membrana y que se acumula en el exterior de la célula y que posteriormente es reconocido por una proteína reguladora citoplásmica que controla la expresión de los genes del operón *luxICDABEG*, que expresan la proteína bioluminiscente (Taga & Bassler, 2003; Reading & Sperandio, 2006).

En el presente trabajo se utilizaron AHLs desde 4 a 14 carbonos de longitud en la cadena de ácido graso (Fig. 9). Las AHLs de cadena media (C8-14) mostraron un efecto dosis-dependiente sobre el desarrollo vegetal, alterando la germinación, el crecimiento de la raíz primaria, la formación de raíces laterales y de los pelos radiculares (Figs. 10-14). Particularmente, la C10-HL mostró una mayor actividad biológica inhibiendo el crecimiento de la raíz primaria y estimulando el crecimiento de las raíces laterales y el desarrollo de pelos radiculares (Figs. 10-14). Estos resultados sugieren que las AHLs pueden alterar la morfogénesis radicular y explicar los efectos benéficos de ciertas rizobacterias promotoras del crecimiento, mediante el aumento en la superficie total de la raíz que puede promover la captación de nutrientes y de agua del suelo (Venturi, 2006).

Los marcadores moleculares *pPRZ1:uidA* y *CyCB1:uidA* mostraron que la inhibición de la raíz primaria por C10-HL se debe a una alteración en la división celular en el meristemo de la raíz primaria, probablemente en la fase G2-M del ciclo celular (Figs. 15-16). Estos efectos estuvieron acompañados por un acelerado programa de diferenciación celular que incluye la formación de pelos radiculares en la proximidad del meristemo. Diferentes bacterias Gram negativas capaces de producir AHLs abundan en la rizósfera (Elasri *et al.*, 2001), por lo que planteamos que la producción de AHLs pueden participar en interacciones planta-bacteria. Aunque los efectos de C10-HL sobre el desarrollo post-embriionario son similares a los efectos de las auxinas, los resultados muestran que la ruta clásica de señalización de auxinas no está involucrada en las respuestas de la arquitectura radicular de *Arabidopsis thaliana* a C10-HL. Esta hipótesis está basada en tres evidencias: 1) estudios de expresión del marcador *DR5:uidA* (Fig. 17), 2) Las respuestas de *Arabidopsis thaliana* y las mutantes insensibles a auxinas *aux1-7* y *axr2* a tratamientos con C10-HL (Figs. 18-20) y 3) La nulidad de la C10-HL para restaurar la formación de pelos radiculares en la mutante *rhd6* (Fig. 21), lo cual sugiere que los efectos de C10-HL en el desarrollo radicular son probablemente mediados por otra ruta de señalización independiente de las auxinas.

En bacterias, el QS puede ser interferido mediante la propia destrucción de las AHLs, previniendo su acumulación, en un proceso denominado “quorum-quenching” (Zhang, 2003). Se han descrito dos enzimas que pueden metabolizar AHLs, una AHL lactonasa, que inactiva la AHL por la hidrólisis del anillo lactona (Dong *et al.*, 2001) y una AHL acilasa, que hidroliza el grupo amida liberando la homoserina lactona de la cadena del ácido graso (Lin *et al.*, 2003). Recientemente, una amido hidrolasa de ácidos grasos que hidroliza NAEs fue identificada en *A. thaliana* permitiendo la obtención de mutantes afectadas en este gen y la sobreexpresión de la enzima en plantas transgénicas (Wang *et al.*, 2006). Las mutantes en la AtFAAH y las líneas sobreexpresantes nos permitió evaluar si la AtFAAH también metaboliza AHLs. La manipulación de la actividad de la amido hidrolasa de ácidos grasos en *Arabidopsis* modificó la sensibilidad a C10-HL (Fig.

22), lo cual sugiere que las plantas poseen la maquinaria enzimática para degradar estos compuestos.

En bacterias, las AHLs son utilizadas para regular la producción de diferentes factores de virulencia y patogenicidad. *Erwinia carotovora* es el agente causante de la pudrición del tejido mediante la producción de varias exoenzimas: celulasas, pectinasas, poligalacturonasas y proteasas. Se ha encontrado que el sistema de QS ExpI-ExpR controla la virulencia de esta bacteria (Cui & Harling, 2005). Una importante alternativa al combate de patógenos de plantas es mediante la regulación del QS. Dong *et al.* (2001), mostró que la sobreexpresión del gene *aiiA* que codifica una lactonasa en plantas de tabaco y papa confiere resistencia a *E. carotovora* resultando una alternativa para controlar la enfermedad. En este contexto, resulta de gran interés el papel que pueda jugar la *AtFAAH* en la modulación del QS como un sistema de quorum-quenching en plantas.

Las AHLs también participan en la simbiosis de las bacterias con las plantas (Parsek & Greenberg, 2000; Rumbaugh, 2007). En este trabajo, se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* como un modelo para el estudio *in vivo* de los efectos de las AHLs producidas por bacterias del género *Pseudomonas* sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas. Se utilizaron tres especies: *P. aeruginosa*, *P. putida* y *P. fluorescens*. La inoculación con cada una de las tres especies bacterianas incrementó la producción de biomasa en comparación con los controles no inoculados (Fig. 23). Además, afectó la arquitectura del sistema radicular (Fig. 24). Estos efectos son interesantes ya que nuestros resultados indican que las AHLs pueden estimular o inhibir el crecimiento de la raíz dependiendo de la estructura del compuesto y su concentración en el medio. En particular, la inoculación con *P. aeruginosa* mimetiza los efectos de las AHLs de cadena media C8-HL a C12-HL inhibiendo el crecimiento de la raíz primaria y estimulando la formación de las raíces laterales (Fig. 24).

*P. aeruginosa* es una bacteria comúnmente presente en el suelo y el agua, descrita como un patógeno de plantas (Walker *et al.*, 2004). *P. aeruginosa* tiene al menos dos sistemas de QS, el sistema *lasI*, en el que participa la N-3-oxo-

dodecanoil-L-homoserina lactona (3-oxo-C12-HL), mientras que en el sistema *rhII*, la *N*-butanoil-L-homoserina lactona (C4-HL) modula el sistema de señalización (Pearson *et al.*, 1995). Se ha reportado que las AHLs de cadena corta y media, tales como la C4-HL y C12-HL se difunden libremente a través de la membrana plasmática y se acumulan en el medio extracelular dependiendo de la densidad poblacional de la bacteria productora de la señal (Pearson *et al.*, 1995). Genéticamente se exploró si las sintasas de AHLs podrían estar involucradas en las alteraciones del crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis thaliana* inoculadas con *P. aeruginosa*. Se encontró que la inhibición del crecimiento de la raíz primaria por *P. aeruginosa* se contraresta por las mutaciones en las sintasas *lasI* y *rhII/lasI* del (Fig. 25). Además, se observó el papel potenciador en la mutante *lasI* en el crecimiento y desarrollo *de novo* de raíces laterales (Fig. 26). El incremento de la producción de biomasa de follaje y raíz en plantas de *A. thaliana* inoculadas con *P. aeruginosa* y en las mutantes afectadas en *lasI*, sugiere la producción bacteriana de AHLs que afectan diferencialmente el crecimiento vegetal.

El incremento en la biomasa vegetal observados en las mutantes *lasI* y *rhII-lasI* se correlacionan con un decremento en la inhibición del crecimiento de la raíz primaria cuando se compara con la cepa silvestre de *P. aeruginosa* (Fig. 26). Utilizando los marcadores *CyCB1:uidA* y *pPRZ1:uidA* encontramos que la mutación en la AHL sintasa *LasI* restaura la actividad mitótica en el meristemo primario, lo cual demuestra que la inhibición del crecimiento por la inoculación bacteriana ocurre, al menos en parte, por la alteración de la división celular en el meristemo, probablemente en la transición G2-M del ciclo celular (Fig. 27).

La *N*-3-hidroxi-octanoil-HL (3-OH-C8-HL) se aisló del medio de crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1 y presento una actividad biológica clara en la modulación del sistema radical de *A. thaliana* (Fig. 28-30). En un estudio realizado por Cui *et al.* (2005), se encontró que este compuesto regula la producción de biosurfactantes vía un sistema de QS en *Pseudomonas fluorescens* 5064, una bacteria patógena del brócoli (*Brassica oleracea* var *Italica*). El principal objetivo de una bacteria invasora es la evasión de las defensas del huésped. Las ventajas del empleo de un mecanismo de QS es evitar la expresión prematura de genes de

virulencia, los cuales podrían alertar al huésped y llevar a cabo una respuesta de defensa, por lo que la invasión bacteriana se restringe hasta que la población alcanza un número de células capaz de infectar con éxito. Se ha sugerido que las plantas tienen la capacidad de detectar las AHLs activando respuestas de desarrollo y defensa (Mathesius *et al.*, 2003). Además, se ha encontrado que la presencia de bacterias productoras de AHLs en la rizósfera de tomate induce respuestas de defensa a etileno y ácido salicílico, el cual juega un papel muy importante en la activación de resistencia sistémica en plantas y confiere resistencia a el hongo patógeno *Alternaria alternata* (Schuhegger *et al.*, 2006). Está pendiente determinar si la inoculación con *P. aeruginosa*, *P. putida* y *P. fluorescens* activan mecanismos de defensa en plantas.

Los mecanismos de señalización por el cual las AHLs alteran el desarrollo de las plantas son desconocidos. Trabajos previos en nuestro laboratorio han demostrado que las plantas producen compuestos con similitud estructural a las AHLs, incluyendo las *N*-acil etanolamidas (NAEs) y las alcanidas. Estos compuestos están distribuidos ampliamente en las plantas, desde los líquenes hasta las angiospermas (López-Bucio *et al.*, 2006; Morquecho-Contreras & López-Bucio, 2007). El tratamiento con concentraciones micromolares de NAEs o alcanidas en plantas de *Arabidopsis* alteran procesos celulares y del desarrollo, incluyendo el crecimiento de la raíz primaria, la formación de raíces laterales, de pelos radiculares y de raíces adventicias (Ramírez-Chávez *et al.*, 2004; López-Bucio *et al.*, 2007; Campos-Cuevas *et al.*, 2008). Lo anterior abre la posibilidad de que las AHLs puedan actuar como señales que mimetizan a las NAEs/alcanidas. Esta hipótesis se refuerza por el hallazgo de que las AHLs (en este trabajo) y NAEs (Wang *et al.*, 2006) pueden ser metabolizadas por medio de la amido hidrolasa de ácidos grasos. Recientemente se ha reportado las semillas en germinación de *Lotus corniculatus* degradan AHLs, lo cual sugiere que esta leguminosa posee la maquinaria enzimática para inactivar estas señales (Delalande *et al.*, 2005). Tales mecanismos podrían participar en la comunicación de las plantas con los microorganismos que habitan en la vecindad de sus raíces para reforzar las relaciones simbióticas obteniendo un beneficio común.

## 9. CONCLUSIONES.

-Las *N*-acil-homoserina lactonas (AHLs) afectan de manera dosis-dependiente la arquitectura del sistema radicular de *Arabidopsis thaliana*, inhibiendo el crecimiento de la raíz primaria y promoviendo la formación de raíces laterales y de pelos radicular.

-La *N*-decanoil homoserina lactona (C10-HL) es el compuesto con mayor actividad biológica de los estudiados en este trabajo. Este compuesto afecta la división celular en el meristemo regulando la transición G2-M del ciclo celular y acelerando el programa de diferenciación en el ápice radicular.

-Los efectos del C10-HL son similares a los observados con la aplicación exógena de auxinas, sin embargo, se encontró que el C10-HL afecta el crecimiento de la raíz mediante un mecanismo independiente de auxinas.

-En un sistema de inoculación *in vivo* con bacterias del género *Pseudomonas*, se encontró que estas bacterias promueven la producción de biomasa del follaje y raíz y afectan la arquitectura del sistema radicular incrementando el área de absorción y su capacidad para la toma de agua y nutrientes. Esta modulación de la arquitectura está regulada por la AHL sintasa LasI y es dependiente de la producción de la *N*-3-hidroxi-octanoil-HL.

-La actividad de la amido hidrolasa de ácidos grasos en *A. thaliana* modifica la sensibilidad a C10-HL, esto sugiere que las plantas poseen la maquinaria enzimática para metabolizar AHLs.

## 10. REFERENCIAS.

- Aguilar J.A., Zavala A.N., Díaz-Pérez C., Cervántes C., Díaz-Pérez A.L. Campos-García J. (2006).** The *atu* and *liu* clusters are involved in the catabolic pathways for acyclic monoterpenes and leucine in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 72:2070-2079.
- Alger B.Z. (2004).** Endocannabinoids: getting the message across. *PNAS* 101:8512-8513.
- Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G., Gilroy S. & Vivanco J.M. (2006).** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:233-266.
- Bauer W.B., Mathesius U. & Teplitski M. (2005).** Eukaryotes deal with bacterial quorum sensing. *ASM News* 71:129-135.
- Bhalerao R.P., Eklöf J., Ljung K., Marchant A., Bennett M. & Sandberg G. (2002).** Shoot derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.* 29:325-332.
- Bishopp A., Mähönen A.P. & Helariutta Y. (2006).** Signs of change hormone receptors that regulate plant development. *Development* 133:1857-1869.
- Blancaflor E.B., Hou G., Chapman K.B., (2003).** Elevated levels of *N*-lauroyl-ethanolamide, and endogenous constituent of desiccated seeds, disrupt normal root development in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Planta* 217:206-217.
- Bosgelmez-Tinaz G. (2003).** Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *Turk J. Biol.* 27:85-93.
- Camili A. & Bassler B.L. (2006).** Bacteria small-molecule signaling pathways. *Science* 311:1113-1116.
- Campos-Cuevas J.C., Pelagio-Flores R., Raya-González J., Méndez-Bravo A., Ortiz-Castro R. & López-Bucio J. (2008).** Tissue culture of *Arabidopsis thaliana* explants reveals a stimulatory effect of alkamides on adventitious root formation and nitric oxide accumulation. *Plant Science* 174:165-173.
- Casimiro I., Marchant A., Bhalerao R.P., Beeckman T., Dhooge S., Swarop R., et al., (2001).** Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* 13:843-852.
- Casimiro J., Beeckman T., Graham N., Bhalerao R., Zhang H., Casero P., Sandberg G. & Bennett M.J. (2003).** Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends Plant Sci.* 8:165-171.
- Celenza J.L., Grisafi P.L., Fink G.R. (1995).** A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* 9:2131-2142.
- Cha C., Gao P., Chen Y.C., Shaw P.D. & Farrand S.K. (1998).** Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by Gram-negative plant-associated bacteria. *Molecular Plant Microbe Interactions* 11:1119-1129.
- Chapman K.D. (2004).** Occurrence, metabolism and prospective functions of *N*-acylthanolamides in plants. *Progress Lipids Research* 43:309-327.
- Cheng J., Seeley K.A. Sung Z.R. (1995).** Rml-1 and Rml-2, *Arabidopsis* genes required for cell proliferation at the root tip. *Plant Physiol* 107:365-376.

- Cho H.T. & Cosgrove D.J. (2002).** Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14:3237-3253.
- Colón-Carmona A., You R., Haimovitch-Gal T. & Doermer P. (1999).** Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant Journal* 20:503-508.
- Cui X. & Harling R. (2005).** *N*-acyl-homoserine lactone-mediated quorum-sensing blockage, a novel strategy for attenuating pathogenicity of Gram-negative bacterial plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 111:327-329.
- Cui X., Harling R., Mutch P. & Darling D. (2005).** Identification of *N*-3-hydroxyoctanoyl-homoserine lactone production in *Pseudomonas fluorescens* 5064, pathogenic to broccoli, and controlling biosurfactant production by quorum-sensing. *European Journal of Plant Pathology* 11:297-308.
- D'Angelo-Piccard C., Faure D., Penot I. & Dessaux Y. (2005).** Diversity of *N*-acyl homoserine lactone-producing and-degrading bacteria in soil and tobacco rhizosphere. *Environmental Microbiology* 7:1796-1808.
- Daniels R., De Vos D.E., Desair J., Raedschelders G., Luyten E., Rosemeyer V., Verreth C., Schoeters E., Vanderleyden J. & Michels M. (2002).** The *cin* quorum-sensing locus of *Rhizobium etli* CNPAF512 affects growth and symbiotic nitrogen fixation. *Journal of Biological Chemistry* 227:462-468.
- Delalande L., Faure D., Raffoux A., Uroz S., D'Angelo-Picard C., Elasri M., Carlier A., Berruyer R., Petit A., Williams P., Dessaux Y. (2005).** *N*-hexanoyl-L-homoserine lactone, a mediator of bacterial quorum-sensing regulation, exhibits plant-dependence stability and may be inactivated by germinated *Lotus corniculatus* seedlings. *FEMS Microbiol Ecol.* 52:13-20.
- Dolan L. & Davies J. (2004).** Cell expansion in roots. *Curr Op. Plant Biol.* 7:33-39.
- Dolan L., Duckett C.M., Grierson C., Linstead P., Schneider K., Lawson E., Dean C., Poething S., Roberts K. (1994).** Clonal relationships and cell patterning in the root epidermis of *Arabidopsis*. *Development* 120:2465-2474.
- Dolan L., Janmaat K., Willemsen V., Linstead P., Poethig J., Roberts K., Scheres B. (1993).** Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119:71-84.
- Dong Y.H., Wang L.H. Xu J.L., Zhang H.B., Zhang X.F., Zhang L.H. (2001).** Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an *N*-acyl homoserine lactonase. *Nature* 411:813-817.
- Dubrovsky J.G., Gambetta G.A., Hernández-Barrera A., Shishkova S. & Gonzalez I. (2006).** Lateral root initiation in *Arabidopsis*: Developmental window, spatial patterning, density and predictability. *Annals of Botany* 97:903-915.
- Elasri M., Delorme S., Lemanceau P., Stewart G., Laue B., Glickmann E., Oger P.M. & Dessaux Y. (2001).** Acyl-homoserine lactone production is more common among plant-associated *Pseudomonas* spp. than among soilborne *Pseudomonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 67:1198-1209.

- Foreman J. & Dolan L. (2001).** Root hairs as a model system for studying plant cell growth. *Annals of Botany* 88:1-7.
- Fuqua C. & Greenberg E.P. (2002).** Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:685-695.
- Fuqua W.C., Winans S.C., Greenberg E.P. (1994).** Quorum-sensing in bacteria: the luxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176: 269-275.
- Gao M.M., Teplitski J.B., Robinson J.B. & Bauer W.D. (2003).** Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum-sensing. *Molecular Plant Microbe Interactions* 16:827-834.
- Gray W.M. (2004).** Hormonal Regulation of plant growth and development. *PLoS Biol* 2:1270-1273.
- Grierson C. & Schiefelbein J. (2002).** Root hairs. *The Arabidopsis book*. American Society of Plant Biologist. pp. 1-22.
- Himanen K., Boucheron E., Vaneste S., de Almedida-Engler J., Inzé D. & Beeckman T. (2002).** Auxin mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell* 14:2339-2351.
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A. & Bevan M.W. (1987).** GUS fusion:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6:3901-3907.
- Kanbe K., Naganawa H., Okamura M., Sasaki T., Hamada M., Okami Y. & Takeuchi T. (1993).** Amidin, a new plant growth-regulating substance isolated from *Amycolatopsis* sp. *Biosci Biotechnol Biochem* 57:1261-1263.
- Kaplan H.B., Greenberg E.P. (1985).** Diffusion of autoinducer is involved in the regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J. Bacteriol.* 163: 1210-1214.
- Kende H. & Zeevaart J.A.D. (1997).** The five "classical" plant hormones. *The Plant Cell* 9:1197-1210.
- Khmel I.A., Veselova M.A., Metlitskaya A.Z., Klein S., Lipasova V.A., Mayatskaya A.V. & Chernin L.S. (2002).** Synthesis of signaling N-acyl-homoserine-lactone participating in quorum-sensing regulation in rhizospheric and soil-borne bacteria *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Russian Journal of Genetics* 38:467-469.
- Kilaru A., Blancaflor E.B., Venable B.J., Tripathy S., Mysore K. & Chapman K.D. (2007).** The N-Acylethanolamide-mediated regulatory pathway in plants. *Chemistry & Biodiversity* 4:1933-1955.
- Laskowski M.J., Williams M.E. Nusbaum H.C. Sussex I.M. (1995).** Formation of lateral root meristem is a two stage process. *Development* 121:3303-3310.
- Li H.M., Altschmied L. & Chory J. (1994).** *Arabidopsis* mutants define downstream branches in the phototransduction pathway. *Genes and Development* 8:339-349.
- Li, L.L., Malone J.E., Iglewski B.H. (2007).** Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulator *VqsR*. *Journal of Bacteriology* 189:4367-4374.
- Lin Y.H. et al. (2003).** Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* str. XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Mol. Microbiol.* 47:849-860.

- Ljung K., Bhalerao R.P. & Sandberg G. (2001). Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J.* 28:465-474.
- López-Bucio J., Acevedo-Hernández G., Ramírez-Chávez E., Molina-Torres J. & Herrera-Estrella L. (2006). Novel signals for plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 9:523-529.
- López-Bucio J., Campos-Cuevas J.C., Hernández-Calderón E., Velázquez-Becerra C., Farías-Rodríguez R., Macías-Rodríguez L.I., Valencia-Cantero E. (2007a). *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root system architecture through an auxin- and ethylene-dependent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *MPMI* 20:207-217.
- López-Bucio J., Cruz-Ramírez A. & Herrera-Estrella L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:280-287.
- López-Bucio J., Millan-Godínez M., Méndez-Bravo A., Morquecho-Contreras A., Ramírez-Chávez E., Molina-Torres J., Pérez-Torres A., Higuchi M., Kakimoto T. & Herrera-Estrella L. (2007). Cytokinin receptors are involved in alkamide regulation of root and shoot development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 145:1703-1713.
- Malamy J.F. & Benfey P.N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124:33-44.
- Manfield M. & Turner S.L. (2002). Quorum-sensing in context: out of molecular biology and microbial ecology. *Microbiology* 148:3762-3764.
- Masucci J.D. & Schiefelbein J.W. (1994). The *rhd6* mutation of *Arabidopsis thaliana* alters root hair initiation through an auxin and ethylene associated process. *Plant Physiology* 106:1335-1346.
- Mathesius U., Mulders S., Gao M.S., Teplitski M., Cactano-Anolles G., Rolfe B.G. & Bauer W.D. (2003). Extensive and specific response of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100:1444-1449.
- Molina-Torres J., Salazar-Cabrera C.J., Armenta-Salinas C. & Ramírez-Chávez E. (2004). Fungistatic and bacteriostatic activities of alkamides from *Heliopsis longipes* roots: Affinin and reduced amides. *J. Agric. Food Chem.* 52:4700-4704.
- Morquecho-Contreras A. & López-Bucio J. (2007). Cannabinoid-like signaling and other new developmental pathways in plants. *International Journal of Plant Developmental Biology* 1:34-41.
- Murashige T. & Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Nagpal P., Walker L.M., Young J.C., Sonawala A., Timpte C., Estelle M. & Reed J.W. (2000). *AXR2* encodes a member of the Aux/IAA protein family. *Plant Physiology* 123:563-573.
- Nealson K.H. & Hastings J.W. (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev.* 43:496-518.
- Parker J.S., Cavell A.C., Dolan L., Roberts K., Grierson C.S. (2000). Genetic interactions during root hair morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12:1961-1974.

- Parsek M.R., Greenberg P. (2000).** Acyl-homoserine lactone quorum-sensing in Gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Procc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:8789-8793.
- Pearson J.P., Gray K.M., Passador L., Tucker K.D., Eberhard A., Iglewski B.H. & Greenberg E.P. (1999).** Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91:197-201.
- Pearson J.P., Passador L., Iglewski B.H., Greenberg E.P. (1995).** A second *N*-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 1490-1494.
- Pesci E.C., Pearson J.P., Seed P.C., Iglewski B.H. (1997).** Regulation of *las* and *rhl* quorum-sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 179:3127-3132.
- Pickett F.B., Wilson A.K., Estelle M. (1990).** The *aux1* mutation of *Arabidopsis* confers both auxin and ethylene resistance. *Plant physiol* 94:1462-1466.
- Pierson L.S. III & Pierson E.A. (2007).** Role of diffusible signals in communication among plant-associated bacteria. *Phytopathology* 97:227-232.
- Pitts R.J. Cernac A., Estelle M. (1998).** Auxin and ethylene promote root hair elongation in *Arabidopsis*. *Plant J.* 16:553-560.
- Prithiviraj B., Bais H.P., Weir T., Suresh B., Najarro E.H., Dyakar B., Schweizer H.P. & Vivanco J.M. (2005).** Down regulation of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by salicylic acid attenuates its virulence on *Arabidopsis thaliana* and *Caenorhabditis elegans*. *Infection and immunity* 73:5319-5328.
- Raduner S., Mejewska A., Chon J.Z., Xie X.Q., Hamon J., Faller B., Altman K.H. & Gertsch J. (2006).** Alkylamides from *Echinaceae* are a new class of cannabinomimetics.
- Ramírez-Chávez E., López-Bucio J., Herrera-Estrella L., Molina-Torres J. (2004).** Alkamides isolated from plants promote growth and alter root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 134:1058-1068.
- Rashotte A., Brady S.R., Reed R.C. Ante S.J. & Muday G.M. (2000).** Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 122:481-490.
- Reading N.C. & Sperandio V. (2006).** Quorum-sensing: the many languages of bacteria *FEMS Microbiology Letters* 254:1-11.
- Ríos-Chávez P., Ramírez-Chávez E., Armenta-Salinas C., Molina-Torres J. (2003).** *Acmella radicans* var. *radicans*: *in vitro* culture establishment and alkamide content. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 39:37-41.
- Rosemeyer V., Michels J., Verreth C. & Vanderleyden J. (1998).** *luxI*- and *luxR*-homologous genes of *Rhizobium etli* CNPAF512 contribute to synthesis of autoinducer molecules and nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Bacteriology* 180:815-821.
- Rumbaugh K.P. (2007).** Convergence of hormones and autoinducers at the host/pathogen interface. *Anal. Bioanal. Chem.* 387:425-435.

- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor N.Y.
- Schauder S. & Bassler B.L. (2001).** The languages to bacteria. *Genes & Dev.* 15:1468-1480.
- Schneider K., Wells B., Dolan L., Roberts K. (1997).** Structural and genetic analysis of epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* primary roots. *Development* 124:1789-1798.
- Schiefelbein J.W., Masucci J.D., Wang H. (1997).** Bulding a root: the control of patterning and morphogenesis during root development. *Plant Cell* 9:1089-1098.
- Schuhegger R., Ihring A., Gantner S., Bahnweg G., Knappe C., Vogg G., Hutzler P., Schmid M., Van Breusegem F., Eber L., Hartmann A. & Langebartels C. (2006).** Induction of systemic resistance in tomato by *N*-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizospheric bacteria. *Plant Cell and Environment* 29:909-918.
- Sieberer T., Hauser M.T., Seifert G.J. & Lusching C. (2003).** *PROPORZ1*, a putative *Arabidopsis* transcriptional adaptor protein, mediates auxin and cytokinin signals in the control of cell proliferation. *Current Biology* 13:837-842.
- Suárez-López P. (2005).** Long-range signaling in plant reproductive development. *Int. J. Dev. Biol.* 49:761-771
- Taga M.E. & Bassler B.L. (2003).** Chemical communication among bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100:14549-14554.
- Ulmasov T., Murfett J., Hagen G., Guilfoyle T. (1997).** Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9:1963-1971.
- Vandelle E., Zaninutto F. & Delledone M. (2007).** Nitric Oxide signalling in plants. Encyclopedia of Life Sciences. John Willey & Sons. Ltd. pp.6
- Venturi V. (2006).** Regulation of quorum-sensing in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiology Reviews* 30:274-291.
- Vieten A., Saver M., Brewer P.B. & Friml J. (2007).** Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends in Plant Science* 12:160-168.
- Walker T.S., Bais H.P., Déziel E., Schwizer P., Rahme L.G., Fall R. & Vivanco J.M. (2004).** *Pseudomonas aeruginosa*-Plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation and root exudation. *Plant Physiology* 134:320-331.
- Wang Y.S., Shrestha R., Kilaru A., Wiant W., Venables B.J., Chapman K.D. & Blancaflor E.B. (2006).** Manipulation of *Arabidopsis* fatty acid amide hydrolase expression modifies plant growth and sensity to *N*-acylethanolamines. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103:12197-12202.
- Waters C.M. & Bassler B.L. (2005).** Quorum-sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21:319-346.
- Wilson A.K., Pickett F.B., Turner J.C. & Estelle M. (1990).** A dominant mutation to *Arabidopsis* confers resistance to auxin, ethylene and abscisic acid. *Mol. Gen. Genet.* 222:377-383.

**Zhang H., Jennings A., Barlow P.W. & Forde B.G. (1999).** Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96:6529-6534.

**Zhang L.H. (2003).** Quorum-quenching and proactive host defense. *TRENDS in plants Science* 8:238-244.

**Zheng H., Zhong Z., Lai X., Chen W.X., Li S. & Zhu J. (2006).** A *luxR/luxI*-type quorum-sensing system in a plant bacterium *Mesorhizobium tianshanense*, controls symbiotic nodulation. *Journal of Bacteriology* 188:1943-1949.

## 11. APÉNDICE.

### Relación de publicaciones con arbitraje estricto derivadas de esta tesis:

1. Campos-Cuevas, Pelagio-Flores R, Raya-González J, Méndez-Bravo A, **Ortiz-Castro R**, López-Bucio J (2008). Tissue culture of *Arabidopsis thaliana* explants reveals a stimulatory effect of alkamides on adventitious root formation and nitric oxide accumulation. *Plant Science* 174: 165-173.
2. **Ortiz-Castro R.**, Valencia-Cantero E., López-Bucio J. (2008). Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signalling. *Plant Signalling and Behavior* 3:263-265.
3. **Ortiz-Castro R**, Martínez-Trujillo M, López-Bucio J (2008). *N*-acyl-L-homoserine lactones: a class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell and Environment* 31:1497-1509.

### Capítulo en libro:

**Ortiz-Castro R**, Méndez-Bravo A, López-Bucio J. Amino compound-containing lipids: A novel class of signals regulating plant development. En: *Plant Developmental Biology-Biotechnological applications*. Eng-Chong P, Davey M (Eds). Springer, Germany. En Prensa.

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article was published in an Elsevier journal. The attached copy is furnished to the author for non-commercial research and education use, including for instruction at the author's institution, sharing with colleagues and providing to institution administration.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



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

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

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

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

Available online 17 November 2007

### Abstract

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

© 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

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

### 1. Introduction

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

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

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

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

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

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

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

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material and growth conditions

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

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

### 2.2. Synthesis of alkamides

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

### 2.3. Analysis of growth

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

### 2.4. Microscopy

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

### 2.5. Imaging of endogenous nitric oxide

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

## 3. Results

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

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

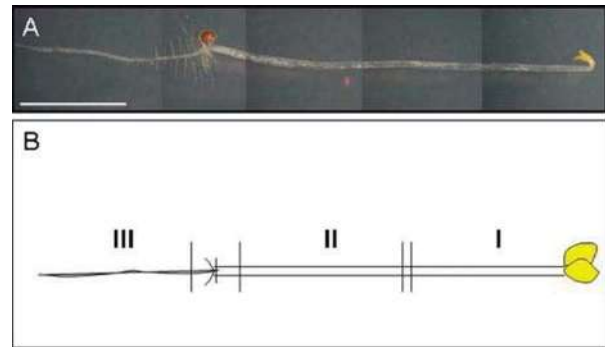


Fig. 1. Dark grown *A. thaliana* plants as a source of explants. *A. thaliana* (Col-0) seeds were sown in 0.2 $\times$  MS agar medium and grown for 7 d under dark conditions. (A) Representative 7 d seedling used as an explant source. (B) Distribution of explants from seedling regions. Scale bar = 0.5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

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

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

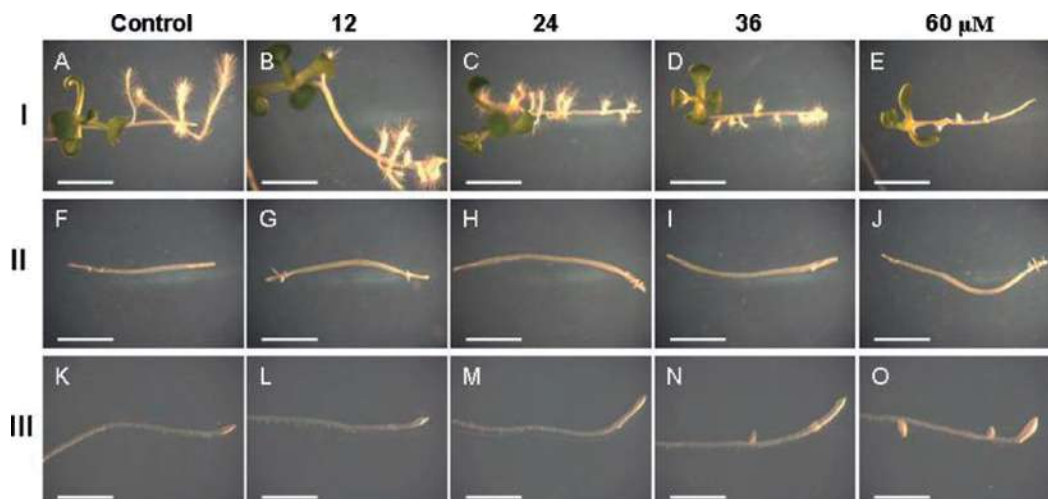


Fig. 2. Growth and developmental responses of *A. thaliana* explants to *N*-isobutyl decanamide. Representative photographs were taken from plants grown for 12 d under the indicated alkamide concentrations. Photographs were taken at 1.5 $\times$  magnification in a Leica MZ6 stereoscopic microscope.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

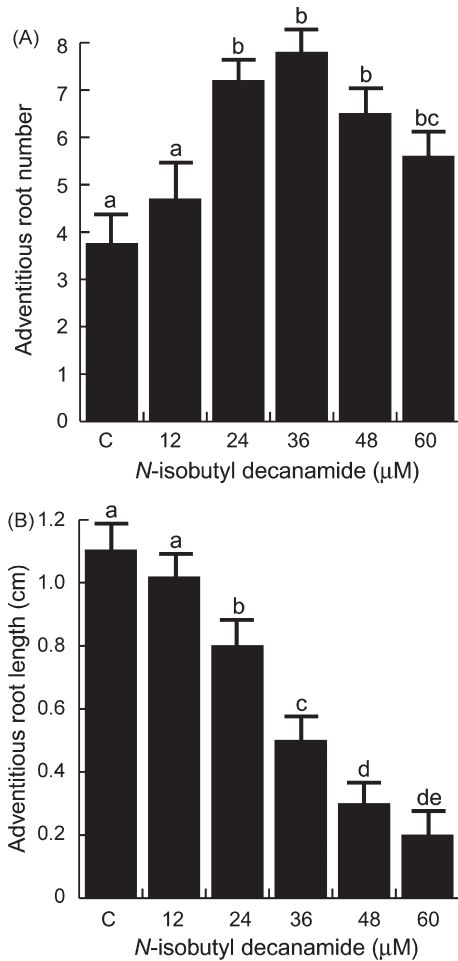


Fig. 3. Effect of *N*-isobutyl decanamide on adventitious root development from type I explants. A. *thaliana* (Col-0) hypocotyl explants were transferred to MS 0.2 $\times$  medium containing the indicated alkamide concentrations. Plants were grown for a further 14 d period and the number (A) and length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

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

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

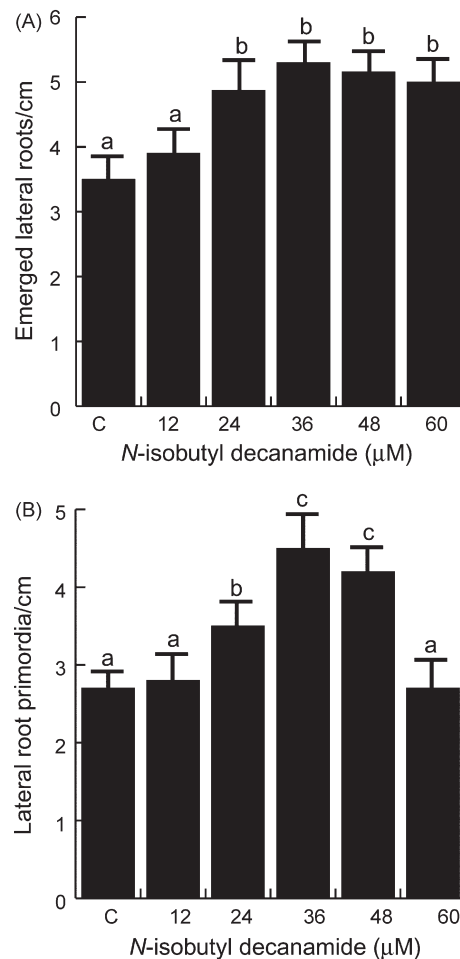


Fig. 4. Effect of *N*-isobutyl decanamide on lateral root development from type III explants. A. *thaliana* (Col-0) primary root explants were transferred to MS 0.2 $\times$  medium containing the indicated alkamide concentrations. Plants were grown for a further 14 d period and the number of emerged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

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

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

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

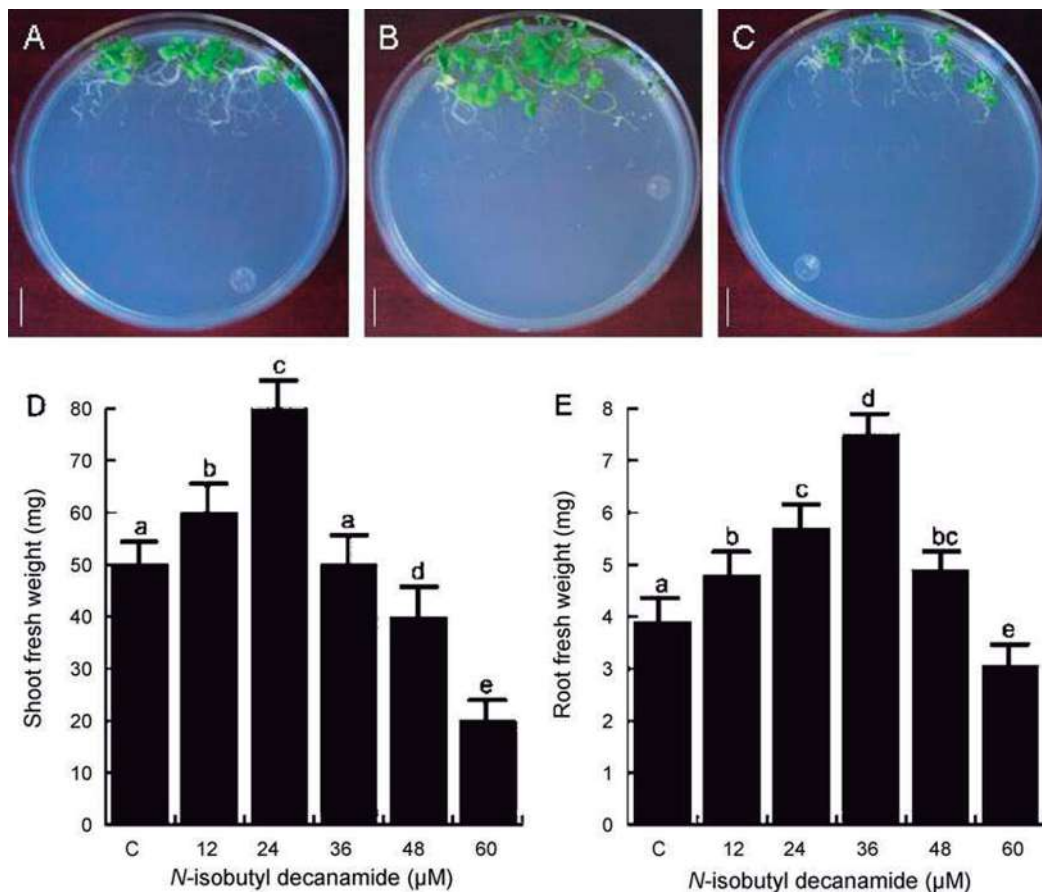


Fig. 5. Effect of *N*-isobutyl decanamide on growth of regenerated *A. thaliana* plants. Type I *A. thaliana* explants were obtained from 7 d dark-grown plants, transferred to MS 0.2× media containing the indicated *N*-isobutyl decanamide concentrations and grown for a further 27 d period. Representative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

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

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

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

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

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

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

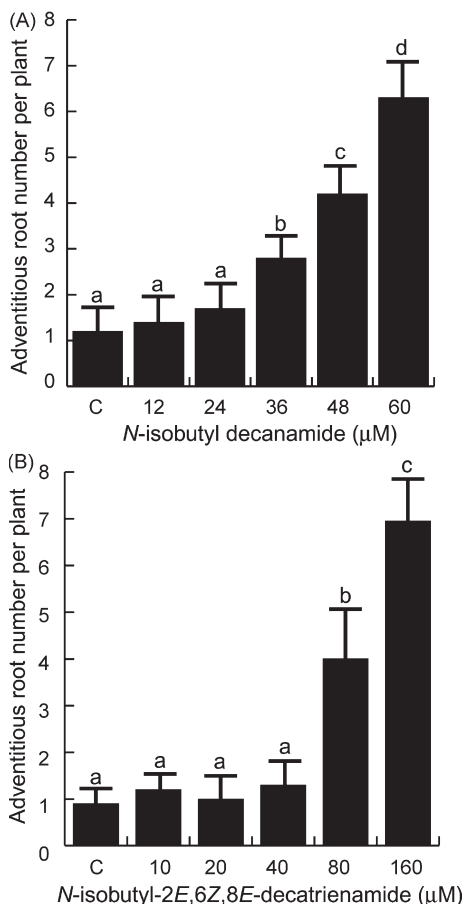


Fig. 6. Effect of alkamides on adventitious root development in *A. thaliana* (Col-0) seedlings. Plants were germinated and grown for 14 d under the indicated alkamide concentrations. (A) Number of adventitious roots per plant in *N*-isobutyl decanamide treatments. (B) Number of adventitious roots per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

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

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

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

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

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

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

## 4. Discussion

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

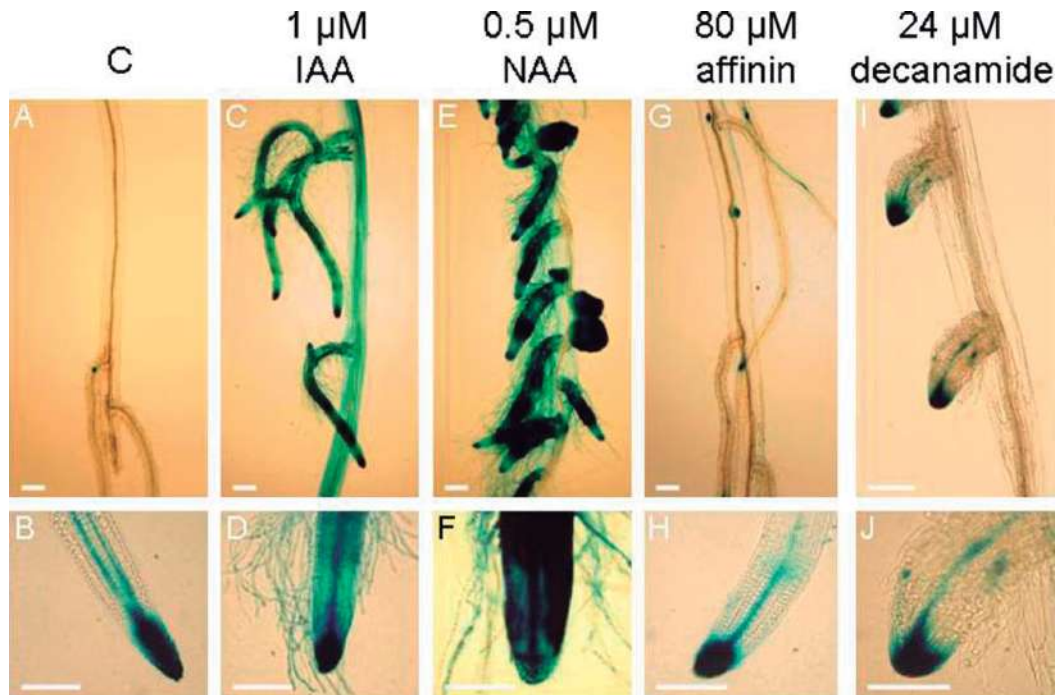


Fig. 7. Effect of alkamides on auxin-regulated gene expression. (A and B) Twelve hours of GUS staining of *DR5:uidA* type I explants grown for 14 d in medium without auxin, (C and D) under 1  $\mu\text{M}$  IAA, (E and F) 0.5  $\mu\text{M}$  NAA, (G and H) 80  $\mu\text{M}$  affinin or (I and J) 24 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

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

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

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

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

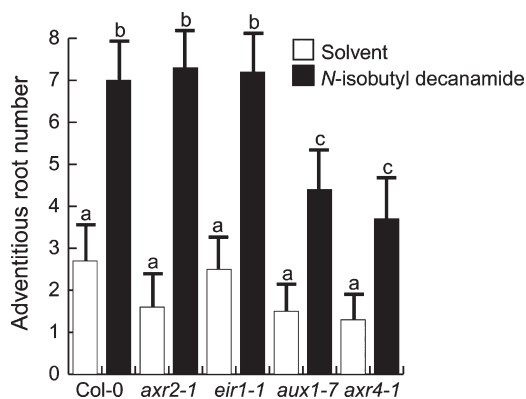


Fig. 8. Adventitious root response of wild-type (Col-0) and auxin-resistant mutants to *N*-isobutyl decanamide. Type I explants were obtained from all plant genotypes and grown for 14 d on MS 0.2 $\times$  medium with or without 24  $\mu\text{M}$  *N*-isobutyl decanamide. Values shown represent the mean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

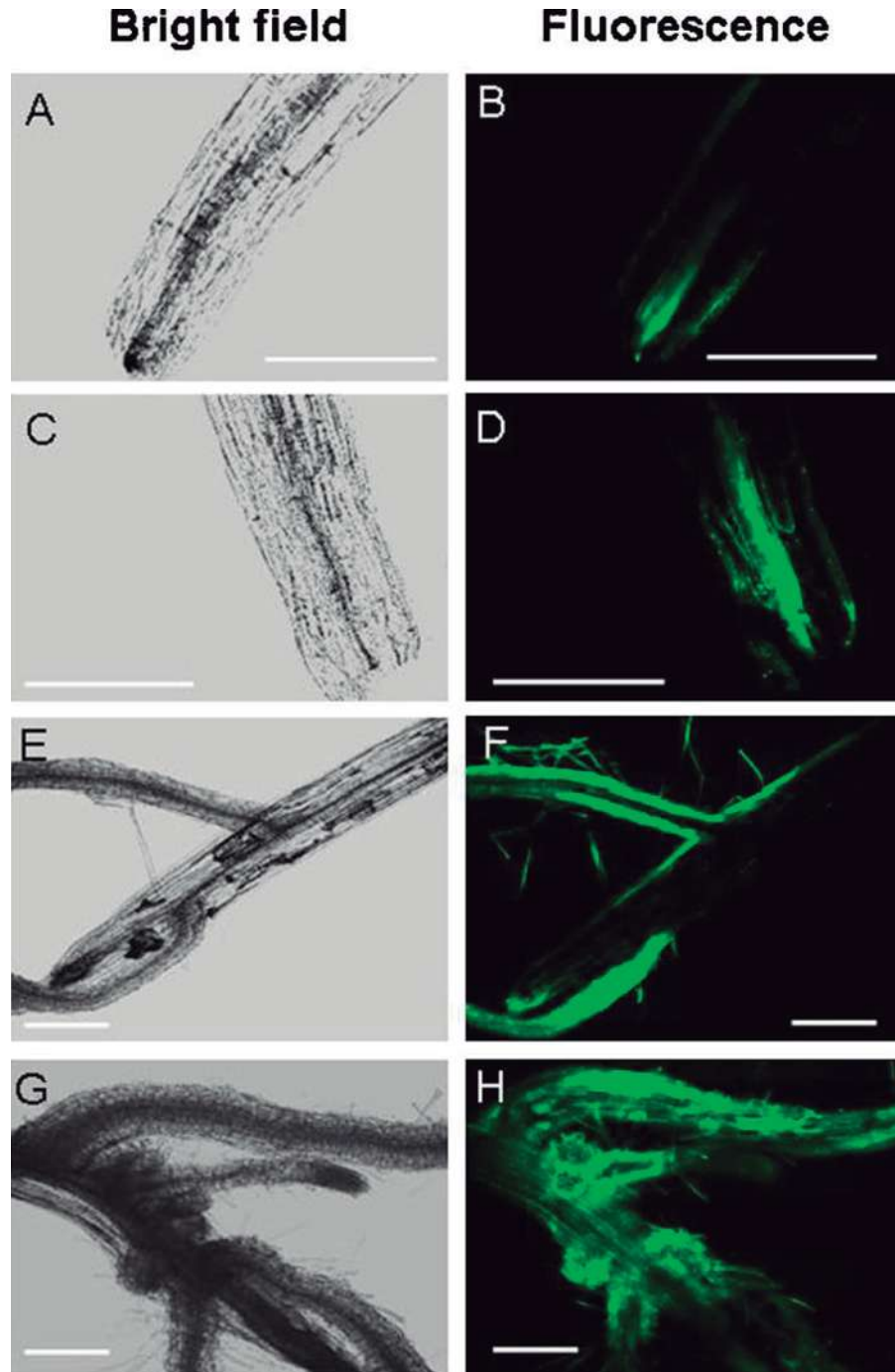


Fig. 9. Effect of *N*-isobutyl decanamide on NO accumulation in *A. thaliana* (Col-0) explants. (A and B) NO accumulation in type I explants grown for 36 h in medium without alkamide, or (C and D) under 36  $\mu$ M *N*-isobutyl decanamide. (E and F) NO accumulation in explants grown for 14 d in medium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

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

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

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

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

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

## Acknowledgements

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

## References

- [1] J. Weyers, N. Paterson, Plant hormones and the control of physiological processes, *New Phytol.* 152 (2001) 375–407.
- [2] A. Cruz-Ramírez, J. López-Bucio, J. Ramírez-Pimentel, A. Zurita-Silva, L. Sánchez-Calderón, E. Ramírez-Chávez, E. González-Ortega, L. Herrera-Estrella, The *xipol1* mutant of *Arabidopsis* reveals a critical role for phospholipid metabolism in root system development and epidermal cell integrity, *Plant Cell* 16 (2004) 2020–2034.
- [3] X. Wang, Lipid signaling, *Curr. Opin. Plant Biol.* 7 (2004) 329–336.
- [4] H.H. Schmid, P.C. Schmid, V. Natarajan, The *N*-acylation-phosphodiesterase pathway and cell signaling, *Chem. Phys. Lipids* 80 (1996) 133–142.
- [5] E.B. Blancaflor, G. Hou, K.D. Chapman, Elevated levels of *N*-lauroylethanolamide, and endogenous constituent of desiccated seeds, disrupt normal root development in *Arabidopsis thaliana* seedlings, *Planta* 217 (2003) 206–217.
- [6] K.D. Chapman, Occurrence, metabolism, and prospective functions of *N*-acylethanolamides in plants, *Prog. Lipids Res.* 43 (2004) 309–327.
- [7] Y.S. Wang, R. Shresta, A. Kilaru, W. Wiant, B.J. Venables, K.D. Chapman, E. Blancaflor, Manipulation of *Arabidopsis* fatty acid amide hydrolase expression modifies plant growth and sensitivity to *N*-acylethanolamines, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006) 12197–12202.
- [8] E. Ramírez-Chávez, J. López-Bucio, L. Herrera-Estrella, J. Molina-Torres, Alkamides isolated from plants promote growth and alter root development in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 134 (2004) 1058–1068.
- [9] J. López-Bucio, G. Acevedo-Hernández, E. Ramírez-Chávez, J. Molina-Torres, L. Herrera-Estrella, Novel signals for plant development, *Curr. Opin. Plant Biol.* 9 (2006) 523–529.
- [10] K. Kanbe, H. Naganawa, M. Okamura, T. Sasaki, M. Hamada, Y. Okami, T. Takeuchi, Amidenin, a new plant growth regulating substance isolated from *Amycolatopsis* sp., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57 (1993) 1261–1263.
- [11] T. Ulmasov, J. Murfett, G. Hagen, T. Guilfoyle, Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements, *Plant Cell* 9 (1997) 1963–1971.
- [12] G. Roman, B. Lubarsky, J. Kieber, E. Rothenberg, J. Ecker, Genetic analysis of ethylene signal transduction in *Arabidopsis thaliana*: five novel mutant loci integrated into a stress response pathway, *Genetics* 139 (1995) 1393–1409.
- [13] F.B. Pickett, A.K. Wilson, M. Estelle, The *aux1* mutation of *Arabidopsis* confers both auxin and ethylene resistance, *Plant Physiol.* 94 (1990) 1462–1466.
- [14] L. Hobbie, M. Estelle, The *axr4* auxin resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* defines a gene important for root gravitropism and lateral root initiation, *Plant J.* 7 (1995) 211–220.
- [15] C. Timppe, A.K. Wilson, M. Estelle, The *axr2-1* mutation of *Arabidopsis thaliana* is a gain-of-function mutation that disrupts an early step in auxin response, *Genetics* 138 (1994) 1239–1249.
- [16] M. Konishi, M. Sugiyama, Genetic analysis of adventitious root formation with a novel series of temperature-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*, *Development* 130 (2003) 5637–5647.
- [17] C. Sorín, J.D. Bussell, I. Camus, K. Ljung, M. Kowalczyk, G. Geiss, H. McKhann, C. Garcion, H. Vaucheret, G. Sandberg, C. Bellini, Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require ARGONAUTE 1, *Plant Cell* 17 (2005) 1343–1359.
- [18] G.C. Pagnussat, M. Simontachi, S. Puntarulo, L. Lamattina, Nitric oxide is required for root organogenesis, *Plant Physiol.* 129 (2002) 954–956.
- [19] G.C. Pagnussat, M.C. Lanteri, L. Lamattina, Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process, *Plant Physiol.* 132 (2003) 1241–1248.
- [20] H. Kojima, N. Nakatsubo, K. Kikuchi, S. Kawahara, Y. Kirino, H. Nagoshi, Y. Hirata, T. Nagano, Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diamino fluoresceins, *Anal. Chem.* 70 (1998) 2446–2453.
- [21] J.E. Malamy, P. Benfey, Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*, *Development* 124 (1997) 33–44.
- [22] I. Casimiro, T. Beekman, N. Graham, R. Bhalerao, H. Zhang, P. Casero, G. Sandberg, M.J. Bennett, Dissecting *Arabidopsis* lateral root formation, *Trends Plant Sci.* 8 (2003) 165–171.
- [23] J. López-Bucio, E. Hernández-Abreu, L. Sánchez-Calderón, A. Pérez-Torres, R.A. Rampey, B. Bartel, L. Herrera-Estrella, An auxin transport independent pathway is involved in phosphate stress-induced root architectural alterations in *Arabidopsis*: identification of BIG as a mediator of auxin in pericycle cell activation, *Plant Physiol.* 137 (2005) 681–691.
- [24] L. Lamattina, C. García-Mata, M. Graciano, G. Pagnussat, Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule, *Ann. Rev. Plant Biol.* 54 (2003) 109–136.
- [25] J. Ludwig-Mueller, A. Vertocnik, C. Town, Analysis of indole-3-butyric acid-induced adventitious root formation on *Arabidopsis* stem segments, *J. Exp. Bot.* 56 (2005) 2095–2105.

## Article Addendum

# Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling

Randy Ortíz-Castro, Eduardo Valencia-Cantero, and José López-Bucio\*

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas; Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; Morelia, Michoacán, México

**Key words:** Arabidopsis, plant growth stimulation, root development, rhizobacteria

Accumulating evidence indicates that plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) influence plant growth and development by the production of phytohormones such as auxins, gibberellins, and cytokinins. Little is known on the genetic basis and signal transduction components that mediate the beneficial effects of PGPRs in plants. We recently reported the identification of a *Bacillus megaterium* strain that promoted growth of *A. thaliana* and *P. vulgaris* seedlings. In this addendum, the role of cytokinin signaling in mediating the plant responses to bacterial inoculation was investigated using *A. thaliana* mutants lacking one, two or three of the putative cytokinin receptors *CRE1*, *AHK2* and *AHK3*, and *RPN12* a gene involved in cytokinin signaling. We show that plant growth promotion by *B. megaterium* is reduced in *AHK2-2* single and double mutant combinations and in *RPN12*. Furthermore, the triple cytokinin-receptor *CRE1-12/AHK2-2/AHK3-3* knockout was insensitive to inoculation in terms of growth promotion and root developmental responses. Our results indicate that cytokinin receptors play a complimentary role in plant growth promotion by *B. megaterium*.

## Introduction

A number of rhizobacterial species associate with plants to increase bacterial fitness and plant growth. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) are free living, rhizosphere-inhabiting bacteria that have a positive influence on plant growth and development.<sup>1,2</sup> These microorganisms, which belong to diverse genera such as *Pseudomonas*, *Azospirillum* and *Bacillus*, have been recognized from a wide range of plant species, such as barley, rice canola, bean and Arabidopsis.<sup>3-5</sup> The contribution of PGPR to plant growth can be

exerted by mechanisms that include competition with deleterious microorganisms,<sup>6</sup> the activation of plant defense responses<sup>7,8</sup> and secretion of plant growth-regulating substances such as auxins, cytokinins and bacterial volatiles.<sup>9-12</sup> Phytohormones are involved in the control of growth and in almost every important developmental process in plants. Bacterial secretion of phytohormones can impact root architecture by overproduction of root hairs and lateral roots and subsequently increase nutrient and water uptake, thus contributing to growth.<sup>2</sup>

To elucidate the signaling mechanisms by which PGPR promote growth and modify plant development, we used *Arabidopsis thaliana* as a model plant to identify bacterial strains with plant growth promoting activity. Our research identified a new strain of *Bacillus megaterium* (UMCV1), which promoted growth of *Arabidopsis thaliana* and *Phaseolus vulgaris* plants in vitro and in soil. Inoculation with *B. megaterium* affected the root system in *A. thaliana* WT plants in a way that suggested the effects mediated by phytohormones, including an inhibition in primary root growth followed by an increase in lateral root number, lateral root growth and root hair length.<sup>13</sup> The effects of bacterial inoculation on seedling growth were found to be independent of auxin- and ethylene- signaling as revealed by increased biomass production and lateral root growth stimulation of auxin-resistant mutants *aux1-7*, *axr4-1* and *eir1-1* and ethylene-response mutants *etr1-1* and *ein2-1*. Moreover, *B. megaterium* inoculation failed to enhance the expression of the *DR5:GUS* auxin-inducible gene marker indicating that this bacteria might not produce auxins.<sup>13</sup> These observations indicate that the signaling pathways involved in growth stimulation in response to inoculation with *B. megaterium* are likely to be identified in plants.

## A Role for Cytokinin Signaling in Plant Growth Stimulation by PGPR

Cytokinins are a class of phytohormones produced by plants and microorganisms.<sup>14</sup> Their production by plant-associated bacteria has been well documented.<sup>15,16</sup> Thus, it can be expected that plant inoculation with bacterial species capable of producing cytokinins may increase the level of cytokinins in root tissues. In turn, this may have an impact on plant growth. In this study, the involvement of cytokinin signaling in mediating the growth and developmental responses of plants to *B. megaterium* inoculation was tested. Three *A. thaliana* cytokinin receptors, *CRE1*, *AHK2* and *AHK3* have been identified (described in refs. 17–20). Single and double mutants of the *CRE1*,

\*Correspondence to: Name: José López-Bucio; Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas; Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; Edificio B3; Ciudad Universitaria. C.P. 58030 Morelia; Michoacán, México; Tel.: 5.443.3265788; Fax: 5.443.3265788 Email: jlbucio@zeus.umich.mx

Submitted: 10/22/07; Accepted: 10/25/07

Previously published online as a *Plant Signaling & Behavior* E-publication: [www.landesbioscience.com/journals/psb/article/5204](http://www.landesbioscience.com/journals/psb/article/5204)

Addendum to: López-Bucio J, Campos-Cuevas J, Hernández-Calderón E, Velásquez-Becerra C, Farías-Rodríguez R, Iveth Macías-Rodríguez L, Valencia-Cantero E. *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root system architecture through an auxin and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* 2007; 20:207–17.

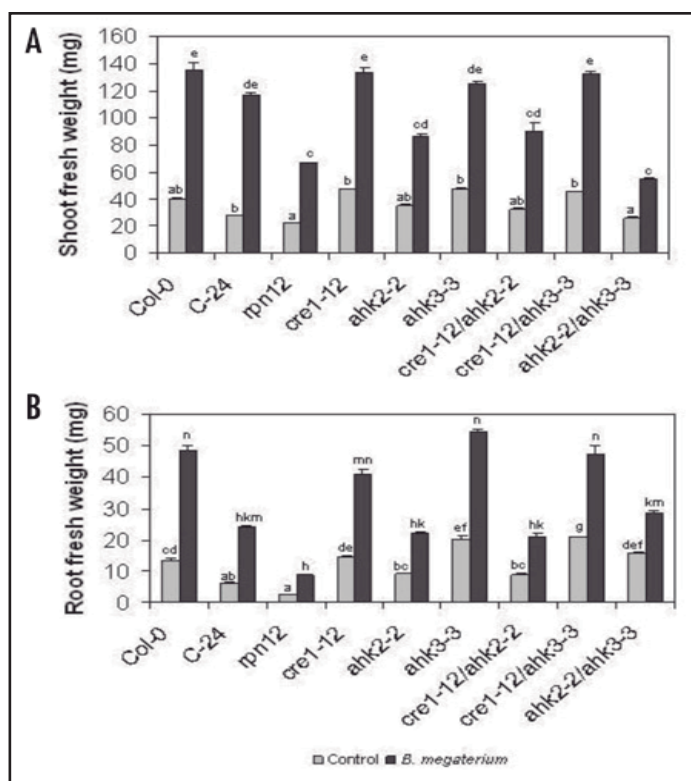


Figure 1. Effects of *Bacillus megaterium* on growth of wild-type lines of Arabidopsis (Col-0 and C-24 ecotypes), and on cytokinin-signaling mutants. Plant material was harvested 6 days after bacterial inoculation at 5 cm from the root tip. Shoots and roots were excised at the root-shoot junction and the fresh weight was determined on an analytical balance. (A) Shoot fresh weight. (B) Root fresh weight. Values shown represent the mean of four groups of 20 seedlings  $\pm$  standard deviation. Different letters are used to indicate means that differ significantly ( $p < 0.05$ ).

*AHK2* and *AHK3* genes have normal root development. However, the *cre1-12/ahk2-2/ahk3-3* triple mutant showed retarded growth of the primary root and arrested shoot development.<sup>17,18</sup> To investigate whether *B. megaterium* inoculation could involve the cytokinin-signaling pathway, we evaluated the effects of bacterial inoculation at 5 cm from the primary root meristem in 5-day WT plants (Col-0 and C-24) and *cre1-12*, *ahk2-2tk*, *ahk3-3*, *cre1-12/ahk2-2tk*, *cre1-12/ahk3-3*, and *ahk2-2tk/ahk3-3* mutant seedlings that were grown in Murashige and Skoog (MS) 0.2x nutrient medium.

After 6 days of growth in the presence of *B. megaterium* the shoot and root biomass were quantified. As shown in Figure 1, bacterial inoculation caused a 3-fold increase in shoot and root fresh weight in WT plants from the Col-0 and C-24 ecotypes. In contrast, the growth promoting effects of inoculation were reduced in *rpn12a-1* (C-24 background), which is defective in a subunit of the Arabidopsis 26S proteasome important for numerous cytokinin regulated growth responses,<sup>21</sup> and in single and double mutant combinations involving the *AHK2-2* cytokinin receptor (Fig. 1A and B). Next we tested the effects of *B. megaterium* inoculation on growth and root development in the triple cytokinin receptor mutant *cre1-12/ahk2-2tk/ahk3-3*. The triple mutant is obtained from a *cre1-12/cre1-12 ahk2-2tk/ahk2-2tk ahk3-3/AHK3* heterozygous population. In agar medium homozygous *cre1-12/ahk2-2tk/ahk3-3* triple mutants develop short primary roots and can be easily distinguished

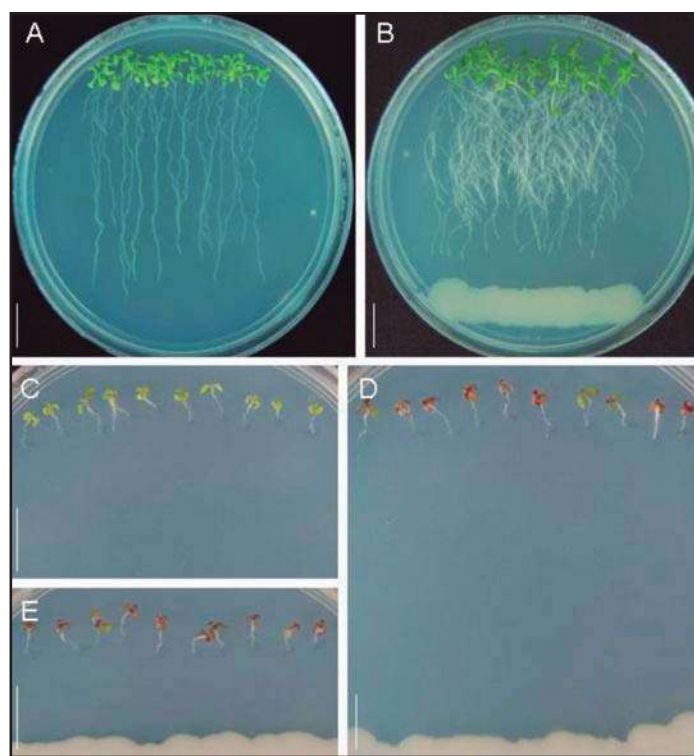


Figure 2. Effect of *Bacillus megaterium* on growth and development of wild-type Arabidopsis (Col-0) and *cre1-12/ahk2-2tk/ahk3-3* triple cytokinin receptor mutant. (A) Arabidopsis (Col-0) plants grown on the surface of agar plates with 0.2x Murashige and Skoog (MS) medium. (B) Arabidopsis plants that were inoculated with *B. megaterium* at a distance of 5 cm from the root tip 5 days after germination and grown for a further 6-day period. (C) *cre1-12/ahk2-2tk/ahk3-3* seedlings uninoculated, (D) inoculated at 5 cm or (E) 2 cm from the primary root tip. Note the elicitation of growth by bacterial inoculation and the formation of branched root systems in WT plants. These effects were absent in the triple cytokinin receptor mutants. Photographs are representative individuals from four plates per treatment.

from *cre1-12/cre1-12 ahk2-2tk/ahk2-2tk ahk3-3/AHK3* heterozygous plants. To select for the triple mutants, a pool of seeds produced by *cre1-12/cre1-12 ahk2-2tk/ahk2-2tk ahk3-3/AHK3* plant were sterilized and sown on agar plates. After 10 days, seedlings with short primary roots were selected and transferred to plates with MS 0.2x fresh medium.

At this time, bacterial inoculation was performed at 2 and 5 cm of distance from root tips and growth and development scored at a further 6-day period. In WT (Col-0) plants, bacterial inoculation stimulated growth and development. In particular, inoculated plants developed a robust root system with proliferating lateral roots (Fig. 2A and B). Growth was severely impaired in *cre1-12/ahk2-2tk/ahk3-3* uninoculated triple mutants, giving rise to dwarf plants with small roots. In these plants, bacterial inoculation at 2 or 5 cm failed to stimulate growth and root development (Fig. 2C–E). Taken together, our results suggest that *AHK2* and *RPN12* play an important role in growth promotion by *B. megaterium* and that the three cytokinin receptors are required for normal growth and developmental responses to bacterial inoculation.

Although the signaling network between plants and rhizobacteria has been extensively studied over the past 20 years, a very few molecular components involved in the interaction between the

bacteria and the plant had been reported until recently.<sup>2</sup> Our work extends this previous knowledge by showing that growth stimulation by *B. megaterium* requires an intact cytokinin-signaling pathway in *A. thaliana*. It is interesting that many PGPR from the rhizosphere can produce cytokinins that exert a pronounced growth stimulatory effect in different crop plants.<sup>9,11</sup> This effect can be mediated by different cytokinin receptor homologs.

#### Acknowledgements

We are thankful to Drs. Tatsuo Kakimoto and Richard D. Vierstra for kindly providing us with *A. thaliana* mutant seeds.

#### References

1. Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr Op Plant Biol* 2001; 4:343-50.
2. Persello-Cartieaux F, Nussaume L, Robaglia C. Tales from the underground: Molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant Cell Environ* 2003; 26:189-99.
3. Alström S. Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere pseudomonads. *J Genet App Microbiol* 1991; 37:495-501.
4. Alexandre G, Jacoud C, Faure D, Bally R. Population dynamics of a motile and a nonmotile *Azospirillum lipoferum* strain during rice root colonization and motility variation in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* 1996; 19:271-8.
5. Persello-Cartieaux F, David P, Sarrobert C, Thibaud MC, Achouack W, Robaglia C, Nussaume L. Utilization of mutants to analyze the interaction between *Arabidopsis thaliana* and its naturally root-associated *Pseudomonas*. *Planta* 2001; 212:190-8.
6. Ongena M, Daayf F, Jacques P, Thonart P, Benhamou N, Paulitz TC, Cornelis P, Koedam N, Belanger RR. Protection of cucumber against *Phytophthora* root rot by fluorescent pseudomonads: Predominant role of induced resistance over siderophores and antibiosis. *Plant Pathol* 1999; 48:66-76.
7. Pieterse CM, van Wees SCM, Hoffland E, van Pelt JA, van Loon LC. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is dependent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* 1996; 8:1225-37.
8. Schuegger R, Ihring A, Gantner S, Bahnweg G, Knappe C, Vogg G, Hutzler P, Schmidt M, van Breusegem F, Eberl L. Induction of systemic plant resistance by *N*-acylhomoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant Cell Environ* 2006; 29:909-18.
9. Selvadurai EL, Brown AE, Hamilton JTG. Production of indole-3-acetic acid analogues by strains of *Bacillus cereus* in relation to their influence on seedling development. *Soil Biol Biochem* 1991; 23:401-3.
10. Leubhn M, Heulin T, Hartmann A. Production of auxin and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots. *FEMS Microbiol Ecol* 1997; 22:325-34.
11. Arkhipova TN, Veselov SU, Melentiev AI, Mertynenko EV, Kudoyarova GR. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant Soil* 2005; 272:201-9.
12. Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Wei HX, Paré PW, Kloepper JW. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:4927-32.
13. López-Bucio J, Campos-Cuevas JC, Hernández-Calderón E, Velásquez-Becerra C, Fariás-Rodríguez R, Macías-Rodríguez LI, Valencia-Cantero E. *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root system architecture through an auxin and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microb Interact* 2007; 20:207-217.
14. Aloni R, Aloni E, Laghans M, Ullrich CI. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: Regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Ann Bot* 2006; 97:883-93.
15. Salamone GIE, Hynes RK, Nelson LM. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can J Microbiol* 2001; 47:404-11.
16. Nieto KF, Frankenberger WT. Microbial production of cytokinins. *Soil Biochem* 1990; 6:191-248.
17. Kakimoto T. Perception and signal transduction of cytokinins. *Annu Rev Plant Biol* 2003; 54:605-27.
18. Higuchi M, Pischke MS, Mähönen AP, Miyawaki K, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Shinozaki K, Kato T, Tabata S, Helariutta Y, Sussman MR, Kakimoto T. In planta functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:8821-6.
19. Nishimura C, Ohashi Y, Sato S, Kato T, Tabata S, Ueguchi C. Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2004; 16:1365-77.
20. Mähönen AP, Bishopp A, Higuchi M, Nieminen KM, Kinoshita K, Törmäkangas K, Ikeda Y, Oka A, Kakimoto T, Helariutta Y. Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science* 2006; 311:94-8.
21. Smalle J, Kurepa J, Yang P, Babychuk E, Kushnir S, Durski A, Vierstra RD. Cytokinin growth responses in *Arabidopsis* involve the 26S proteasome subunit RPN12. *Plant Cell* 2002; 14:17-32.

# ***N*-acyl-L-homoserine lactones: a class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana***

RANDY ORTÍZ-CASTRO<sup>1</sup>, MIGUEL MARTÍNEZ-TRUJILLO<sup>2</sup> & JOSE LÓPEZ-BUCIO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Edificio B3 and <sup>2</sup>Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B4, Ciudad Universitaria, C.P. 58030 Morelia, Michoacán, Mexico

## **ABSTRACT**

***N*-acyl-homoserine lactones (AHLs) belong to a class of bacterial quorum-sensing signals important for bacterial cell-to-cell communication. We evaluated *Arabidopsis thaliana* growth responses to a variety of AHLs ranging from 4 to 14 carbons in length, focusing on alterations in post-embryonic root development as a way to determine the biological activity of these signals. The compounds affected primary root growth, lateral root formation and root hair development, and in particular, *N*-decanoyl-HL (C10-HL) was found to be the most active AHL in altering root system architecture. Developmental changes elicited by C10-HL were related to altered expression of cell division and differentiation marker lines *pPRZI:uidA*, *CycB1:uidA* and *pAtEXP7:uidA* in *Arabidopsis* roots. Although the effects of C10-HL were similar to those produced by auxins in modulating root system architecture, the primary and lateral root response to this compound was found to be independent of auxin signalling. Furthermore, we show that mutant and overexpressor lines for an *Arabidopsis* fatty acid amide hydrolase gene (*AtFAAH*) sustained altered growth response to C10-HL. All together, our results suggest that AHLs alter root development in *Arabidopsis* and that plants possess the enzymatic machinery to metabolize these compounds.**

*Key-words:* *Arabidopsis*; *N*-acyl-homoserine lactones; quorum-sensing; root architecture.

## **INTRODUCTION**

Many bacterial species use small molecule signalling to communicate with each other and to coordinate their growth activities – a process commonly referred to as quorum sensing (QS) (Taga & Bassler 2003; Reading & Sperandio 2006). Diverse gram-negative bacteria produce *N*-acyl-homoserine lactones (AHLs); these compounds contain a conserved homoserine lactone (HL) ring and an amide (*N*)-linked acyl side chain. The acyl groups of naturally occurring AHLs range from 4 to 18 carbons in length;

they can be saturated or unsaturated and with or without a C-3 substituent (Waters & Bassler 2005; Camilli & Bassler 2006). These chemical signals are produced by specific enzymes, and they are detected by specific receptors (Pearson *et al.* 1994; Parsek *et al.* 1999). Moreover, the specific activity of the different compounds can be determined by the lactone ring, the amide group and the fatty acid chain length (Zhu *et al.* 1998; Vannini *et al.* 2002; Raffa *et al.* 2004).

Recent information indicates that bacteria commonly associated to plants are capable to produce a variety of AHLs (Cha *et al.* 1998; Elasri *et al.* 2001; Khmel *et al.* 2002; D'Angelo-Picard *et al.* 2005). Phytopathogenic bacteria including *Pseudomonas syringae* and *Erwinia chrysantemi* cause disease on plants. In these bacterial species, virulence factors are regulated via AHL synthesis (Taguchi *et al.* 2006; Hussain *et al.* 2008).

The presence of AHL-producing bacteria in the rhizosphere of tomato induced the salicylic acid and ethylene-dependent defence response, which plays an important role in the activation of systemic resistance in plants and conferred resistance to the fungal pathogen *Alternaria alternata* (Schuhegger *et al.* 2006).

In addition, certain *Rhizobium* mutants that fail to produce or sense AHLs were unable to nodulate legume plants, suggesting that AHLs might also participate in beneficial plant–bacteria interactions (Rosemeyer *et al.* 1998; Daniels *et al.* 2002; Zheng *et al.* 2006). Mathesius *et al.* (2003) showed that *Medicago truncatula* plants are able to sense AHLs and that low concentrations of these compounds elicit major changes in protein expression. The possibility is open that plants could sense AHLs to respond to bacterial populations.

Plants produce substances that mimic AHLs. At least 10 chromatographically separable active compounds can be detected in root exudates of *M. truncatula* (Gao *et al.* 2003). These plant compounds can affect QS responses in bacteria, indicating that plants produce compounds that appear to be AHL signal mimics (Teplitski, Robinson & Bauer 2000; Gao *et al.* 2003). None of these compounds has yet been chemically identified, so their structural similarities to bacterial AHLs are unknown.

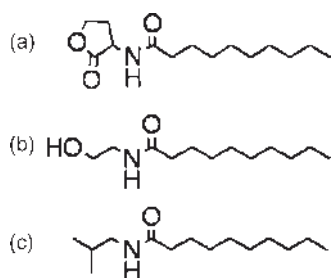
Plants produce compounds with structural similarity to AHLs, including *N*-acyl ethanolamines (NAEs) and

*Correspondence:* J. López-Bucio. Fax: +443 3265788; e-mail: jlbucio@zeus.umich.mx

alkamides. These compounds have been considered a novel class of plant signals because of their wide distribution in plants and their potent biological activities (Chapman 2004; López-Bucio *et al.* 2006; Morquecho-Contreras & López-Bucio 2007). A role of NAEs in plant development has been inferred from the work by Blancaflor, Huo and Chapman (2003), who showed that application of micromolar concentrations of *N*-lauroylethanolamide (NAE12:0) to *Arabidopsis* seedlings inhibited primary root growth and stimulated lateral root development. Similarly, alkamides isolated from plants have been found to alter root and shoot system architecture in *Arabidopsis* by affecting cell division and differentiation processes. Morphogenetic responses affected by alkamides included primary root growth, lateral root formation, root hair formation and growth, adventitious root formation, and leaf formation (Ramírez-Chávez *et al.* 2004; López-Bucio *et al.* 2007; Campos-Cuevas *et al.* 2008).

The similarity in chemical structures of *N*-decanoyl homoserine lactone (C10-AHL, a bacterial QS compound) with NAE10:0 and *N*-isobutyl decanamide (an alkamide) (Fig. 1) provides us with the basis to hypothesize that AHLs could alter plant development. AHLs are composed of an acyl chain linked to an amide, being the most important difference the presence of a homoserine lactone ring in the side chain in AHLs, which is absent in NAEs and alkamides. Perhaps more compelling is the fact that AHLs are widely distributed in bacteria that associate with plants (Cha *et al.* 1998; Elasri *et al.* 2001; Khmel *et al.* 2002; D'Angelo-Picard *et al.* 2005), and plants produce compounds that affect the bacterial QS (Gao *et al.* 2003; Teplitski *et al.* 2004).

To test the hypothesis that AHLs alter plant development and to explore in more detail the cellular basis of plant responses to these compounds, we evaluated the root developmental responses of *Arabidopsis* to exogenous applications of AHLs with acyl chain length from 4 to 14 carbons. Our results provide cellular, physiological and genetic evidence that AHLs modulate root system architecture and that plants possess the enzymatic machinery to metabolize these compounds.



**Figure 1.** Comparative structures of C10-HL and related compounds from plants. (a) *N*-decanoyl-homoserine lactone (C10-HL). (b) *N*-ethanol decanamide (NAE10:0). (c) *N*-isobutyl decanamide.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material and growth conditions

*Arabidopsis* (Col-0 ecotype) and the transgenic lines *pPRZ1:uidA* (Sieberer *et al.* 2003), *CyCB1:uidA* (Colón-Carmona *et al.* 1999), *pAtEXP7:uidA* (Cho & Cosgrove 2002), *DR5:uidA* (Ulmasov *et al.* 1997), *AtFAAH* overexpressor OE7A and mutant KO118043 (Wang *et al.* 2006) lines, *aux1-7* (Pickett, Wilson & Estelle 1990), *doc1* (Li, Altschmied & Chory 1994) and *axr2* (Timpote, Wilson & Estelle 1994) were used for all experiments. Seeds were surface sterilized with 95% (v/v) ethanol for 5 min and 20% (v/v) bleach for 7 min. After five washes with sterile distilled water, seeds were germinated and grown on agar plates containing 0.2× MS medium (Murashige & Skoog 1962). MS medium (Murashige and Skoog basal salts mixture, Cat. M5524) was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). The suggested formulation is 4.3 g L<sup>-1</sup> of salts for a 1× concentration of medium; we used 0.9 g L<sup>-1</sup>, which we consider and refer to as MS 0.2×. This medium lacks amino acids and vitamins. *N*-acyl-homoserine lactones were purchased from Sigma. Ethanol-dissolved compounds were added to cooled (50 °C) molten medium and poured into plates. In control seedlings, we added the solvent in equal amounts as present in the greatest concentration of AHL tested. Phytagar (micropropagation grade) was purchased from Phytotechnology (Shawnee Mission, KS, USA). Plants were placed in a plant growth chamber (Percival Scientific AR-95L) with a photoperiod of 16 h of light, 8 h of darkness, light intensity of 100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> and temperature of 22 °C.

### Analysis of growth

Growth of primary roots was registered using a ruler. Lateral root number and lateral root primordia (LRP) were determined by counting the lateral roots or LRP present in the primary root, from the tip to the root/stem transition. Lateral root and primordia densities were determined by dividing the lateral root number by the primary root length and expressed as LRP cm<sup>-1</sup>. Trichoblasts and root hairs were measured in a 500 μm region from the primary root tip. The average length of root hairs was determined upon measuring 10 hairs, taking as a reference the root protoxilematic plane to locate the radical hair base in the epidermic cell. Fresh weight of plants was determined with an Ohaus analytical balance (Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ, USA) with a 0.0001 g precision value. For all experiments, the overall data were statistically analysed in the SPSS 10 program (SPSS, Chicago, IL, USA). Univariate and multivariate analyses with a Tukey's post hoc test were used for testing differences in growth and root developmental responses in wild type (WT). Different letters are used to indicate means that differ significantly ( $P < 0.05$ ).

### Histochemical analysis

Transgenic plants that express the *uidA* reporter gene (Jefferson, Kavanagh & Bevan 1987) were stained in 0.1%

X-Gluc (5-bromo-4-chlorium-3-indolyl,  $\beta$ -D-glucuronide) in phosphate buffer ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  and  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.1 M, pH 7) with 2 mM potassium ferrocyanide and 2 mM potassium ferricyanide, for 12 h at 37 °C. Plants were cleared and fixed with 0.24 N HCl in 20% methanol (v/v) and incubated for 60 min at 62 °C. The solution was substituted for 7% NaOH (w/v) in 60% ethanol (v/v) for 20 min at room temperature. Plants were dehydrated with ethanol treatments at 40, 20 and 10% (v/v) for a 24 h period each, and fixed in 50% glycerol (v/v). The processed roots were included in glass slips and sealed with commercial nail varnish.

## Microscopy

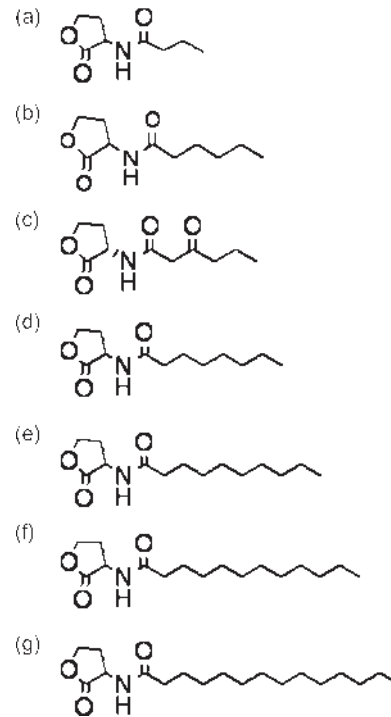
The *Arabidopsis thaliana* root system was analysed with a stereoscopic microscope (Leica MZ6, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Total lateral roots were counted at 30 $\times$  magnification. The primordial phases of primary and lateral roots were analysed in semi-permanent preparations of cleared roots using a composed microscope (Axiostar Zeiss Plus, Carl Zeiss, Göttingen, Germany) at 100 $\times$  or 400 $\times$  magnifications. Images were captured with a Sony Cyber-shot DSC-S75 digital camera (Sony Electronics Inc., Oradell, NJ, USA) adapted to the microscope and processed with the Zeiss Axio Vision 4AC software (Carl Zeiss).

## RESULTS

### AHLs modify *Arabidopsis* root system architecture

AHLs are a diverse class of hormones used by gram-negative bacteria for cell-to-cell communication. Thus, the hypothesis that plants could sense AHLs was investigated by testing the *Arabidopsis* root developmental responses to these compounds. Three main processes are involved in determining root system architecture: (1) primary root growth; (2) lateral root formation; and (3) root hair development, thus contributing to the total absorptive capacity for water and nutrients. We evaluated the effect of seven AHLs with different chain lengths (Fig. 2a–g) on primary root growth.

To determine the effect of AHLs on growth, *Arabidopsis* plants were germinated and grown on 0.2 $\times$  MS-agar media supplemented with AHL concentrations from 12 to 192  $\mu\text{M}$  and primary root length recorded 10 d after germination (d.a.g.). We found that the effects of each AHL were dependent on the structure and the concentration of the compound. Small-chain (C4 and C6) AHLs did not significantly affect primary root growth (Fig. 3a). On the contrary, medium-chain AHLs showed dose-dependent inhibitory effects on primary root growth, for which C10-HL showed the greatest biological activity (Fig. 3a). C10-HL concentration of 48  $\mu\text{M}$  caused an 80% reduction in root primary length. Interestingly, the decrease of primary root length by AHL treatment was accompanied by a shift in root system architecture from a taproot architecture to a more branched exploratory system (Fig. 3b–q). Similar effects

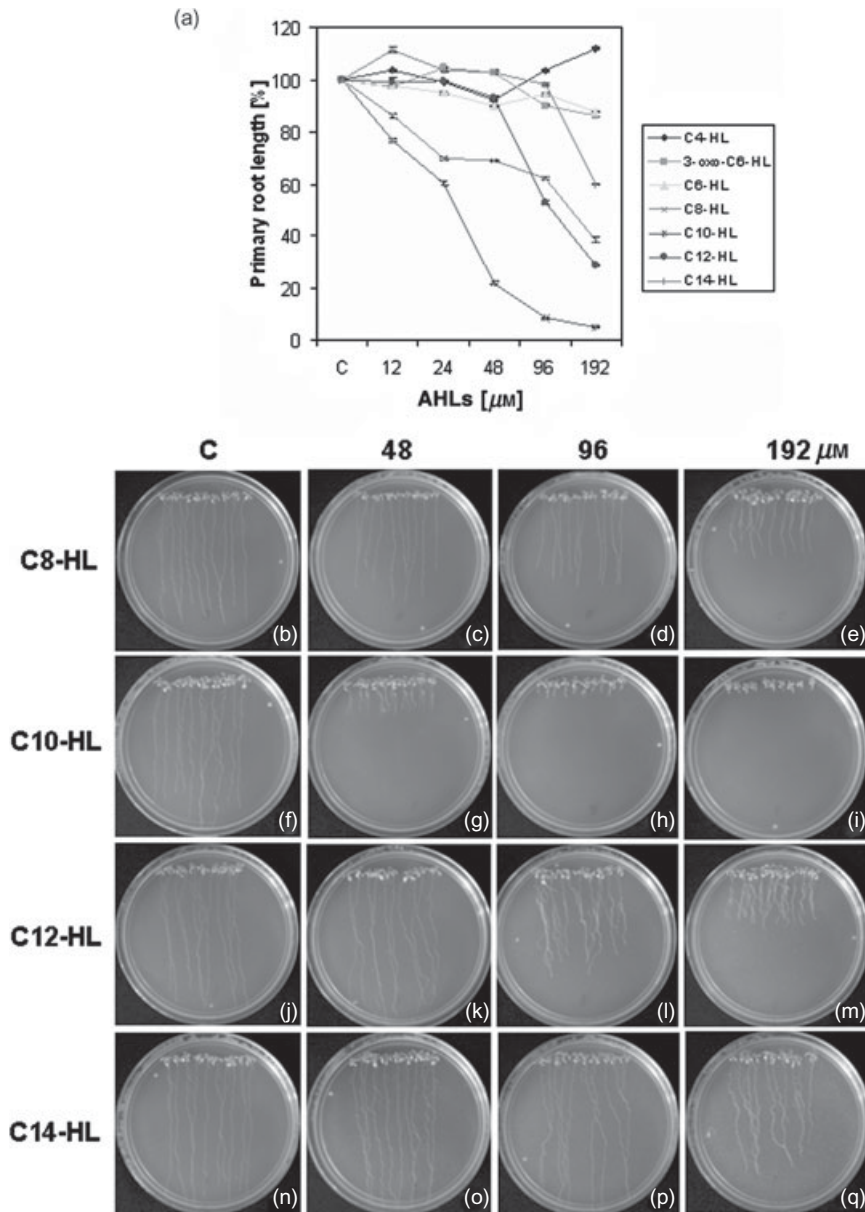


**Figure 2.** Chemical structures of *N*-acyl-homoserine lactones used in this study: (a) *N*-butyryl-homoserine lactone (C4-HL), (b) *N*-hexanoyl-homoserine lactone (C6-HL), (c) *N*-3-oxo-hexanoyl-homoserine lactone (3-oxo-C6-HL), (d) *N*-octanoyl-homoserine lactone (C8-HL), (e) *N*-decanoyl-homoserine lactone (C10-HL), (f) *N*-dodecanoyl-homoserine lactone (C12-HL), (g) *N*-tetradecanoyl-homoserine lactone (C14-HL).

were observed for C8, C12 and C14-AHL, albeit at increased concentrations of the compounds (Fig. 3b–q). These results indicate that the length of the acyl chain appears to be important for AHL activity to alter root system architecture in *Arabidopsis*.

### C10-HL promotes lateral root development in *Arabidopsis* seedlings

The effect of AHLs promoting lateral root formation could be due to a stimulation of the emergence of pre-existing LRP or to *de novo* formation of additional LRP. To establish the developmental basis for the effect of C10-AHL on lateral root formation, LRP originating in the primary root were quantified at 7 d.a.g. We used *pPRZ1::GUS* seedlings to visualize LRP in primary roots. *pPRZ1::GUS* seedlings were grown for 6 d in MS 0.2 $\times$  medium supplied with 12 to 192  $\mu\text{M}$  concentrations of C10-HL, and then stained for  $\beta$ -glucuronidase (GUS) activity and cleared to enable LRP at early stages of development to be visualized and counted. Each LRP was classified according to its stage of development as reported by Zhang *et al.* (1999), who consider the following stages: stage A, up to three cell layers; stage B, unemerged, of more than three cell layers; stage C, LR



**Figure 3.** Effect of *N*-acyl-homoserine lactones (AHLs) on *Arabidopsis* root development. *Arabidopsis thaliana* seedlings were germinated and grown on 0.2 $\times$  MS-agar medium for 10 d and the growth of primary roots recorded. (a) The primary root growth inhibition (%) of AHL-treated seedlings as compared with seedlings grown in media supplied with the solvent only. (b–q) Differential effects of AHLs on root system architecture. Representative photographs were taken from plants grown under the indicated compound. Values shown represent the mean  $\pm$  SD ( $n = 30$ ). The experiment was replicated three times with similar results.

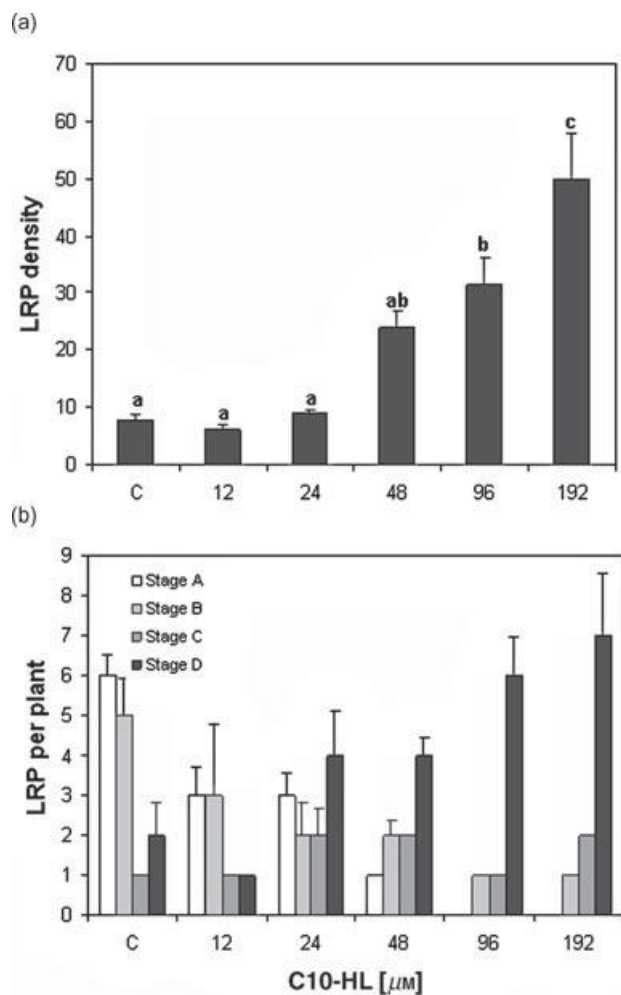
emerged of less than 0.5 mm in length; stage D, lateral root larger than 0.5 mm.

The LRP density (number of LRP  $\text{cm}^{-1}$ ) revealed that plants treated with 48  $\mu\text{M}$  or greater concentration of C10-HL formed a significantly higher number of LRP. A 192  $\mu\text{M}$  concentration of this compound elicited a fivefold increase in LRP density when compared with solvent-treated control seedlings (Fig. 4a). The stage distribution of LRP was also affected by C10-HL. Treatments from 24 to 192  $\mu\text{M}$  C10-HL increased the number of LRP in stage D compared with the control (Fig. 4b). The observations that C10-HL treatments increased LRP density and the transition of LRP from early developmental stages (stages A, B and C) to an advanced developmental stage (stage D) suggest that C10-HL can promote root branching by inducing LRP initiation and further growth of LRP.

### AHLs alter root hair development

Root hairs are root epidermal cells that participate in nutrient and water uptake. To analyse whether AHLs could alter root hair development, we performed experiments in which *Arabidopsis* WT (Col-0) seedlings were germinated and grown on the surface of agar plates containing different concentrations of five AHLs from 3-oxo-C6-HL to C14-HL.

Root hair parameters were analysed 9 d.a.g. on primary roots of solvent-treated or AHL-treated seedlings. Figure 5 shows representative photographs of root hairs formed in the different concentrations of AHLs. Solvent-treated control seedlings showed the cellular typical organization of the primary root tip, with root hairs forming at a distance from the root tip (Fig. 5a). Small-chain (C6 and C8) AHLs did not modify root hair development (Fig. 5b–j), while C10

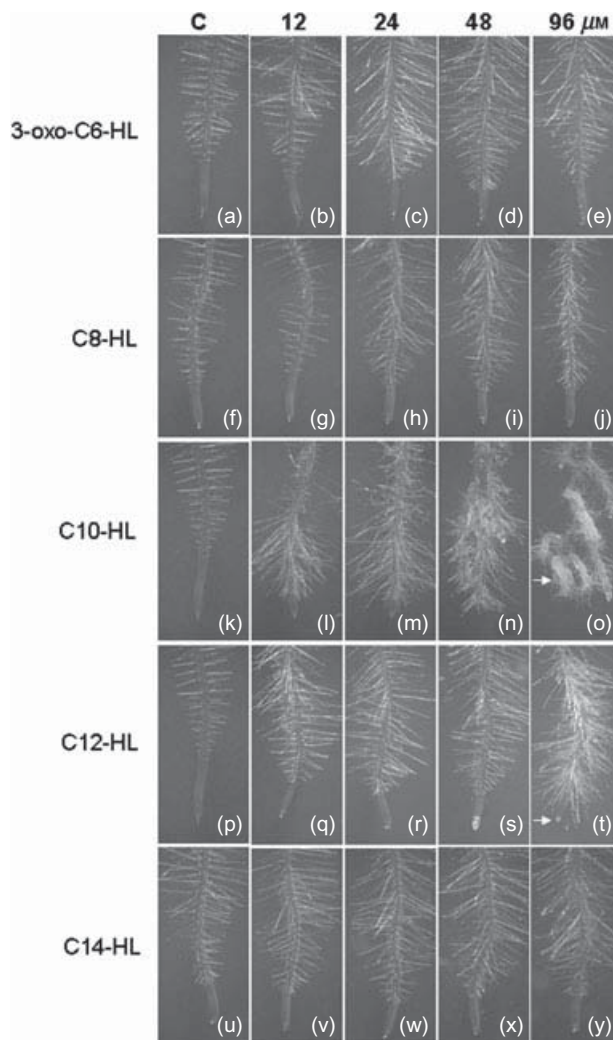


**Figure 4.** Effect of C10-HL on *Arabidopsis* lateral root development. (a) Density of lateral root primordia (LRP number cm<sup>-1</sup>). (b) LRP stage distribution. *pPRZ1:uidA Arabidopsis thaliana* seedlings were grown for 10 d on MS 0.2× medium supplemented with the indicated concentrations of C10-HL. The plants were stained for β-glucuronidase activity and cleared to show gene expression. The number and stage of LRP were recorded. The results show the primordia at each developmental stage according to Zhang *et al.* (1999) for 10 individual roots. Data points represent mean ± SD (*n* = 10). This analysis was repeated twice with similar results. Different letters indicate statistical differences at *P* < 0.05.

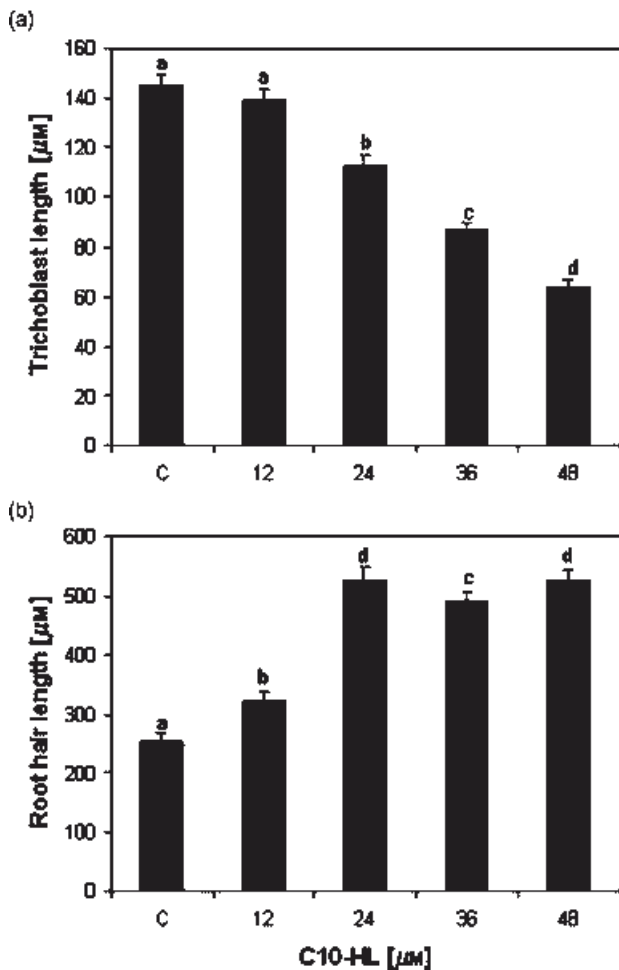
and C12-HL altered root hair development in a dose-dependent way. In particular, C10-HL at concentrations from 12 to 48 μM promoted root hair formation close to the root tip (Fig. 5k–n), whereas a greater concentration was found to stimulate lateral root formation at the root tip region (Fig. 5o). C12-HL stimulated root hair formation and growth at concentrations from 48 to 96 μM (Fig. 5p–t). In the greatest concentration tested, root hair formation close to the root tip could be observed (Fig. 5t). C14-HL effects on root hair development were similar to those observed for small-chain AHLs (Fig. 5u–y). C10 and C12-HL showed the clearest promoting effects on root hair

development, indicating the importance of acyl chain length for biological activity of AHLs.

To investigate more deeply the effects of C10-HL on root hair density, we measured the trichoblast length and root hair length on 6-day-old *Arabidopsis* seedlings subjected to different concentrations of this compound. Trichoblasts are the hair formation root epidermal cells that form cell files along the root surface. We found a dose-dependent decrease in trichoblast length in response to C10-HL treatment (Fig. 6a), while root hair length significantly increased at 12 μM C10-HL treatment (Fig. 6b). The most stimulating effects of C10-HL on root hair growth were observed in concentrations of 24 μM or greater, in which a roughly twofold increase in root hair length was recorded in roots of C10-HL-treated plants when compared with roots of plants treated with solvent only (Fig. 6b). These results suggest that medium-chain AHLs alter root hair development and



**Figure 5.** Effect of *N*-acyl-homoserine lactones on root hair development. Representative photographs of root hairs formed at the primary root tip region of 9-day-old *Arabidopsis* seedlings grown in the presence of the indicated compounds.



**Figure 6.** Effects of C10-HL on epidermal cell differentiation: (a) trichoblasts length and (b) root hair length. *Arabidopsis thaliana* seedlings were grown for 8 d on MS 0.2 $\times$  supplemented with the indicated concentrations of C10-HL. Date points indicated mean  $\pm$  SD ( $n = 20$ ). The results show mean of 10 epidermal cells located in the root hair-forming zone of the primary root. This experiment was repeated twice with similar results. Different letters indicate statistical differences at  $P < 0.05$ .

that C10-HL increases root hair density and root hair growth.

### C10-HL affects cell division and differentiation in *Arabidopsis* roots

The post-embryonic root developmental effects of medium-chain AHLs in *Arabidopsis* seedlings suggested that these compounds could play an important role in cell division. Next, we used C10-HL, the most active AHL among those investigated (Fig. 3), to study the effects of this compound on cell division and differentiation gene expression markers.

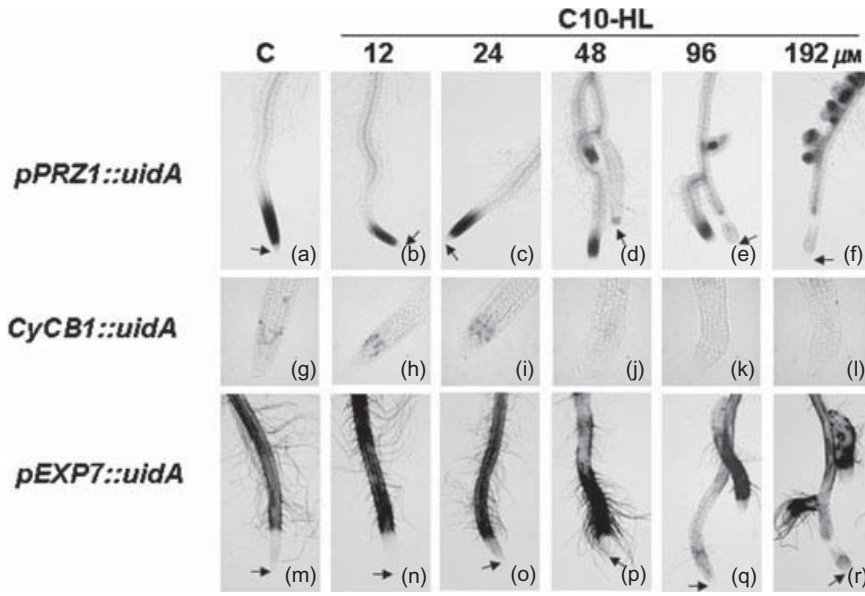
To investigate the pattern of cell division in response to C10-HL, we analysed the expression of *pPRZ1:uidA*, which marks only active meristems (Sieberer *et al.* 2003) and *CycB1:uidA*, which is expressed only in cells in the G2/M

phase of the cell cycle and is a marker of mitotic activity (Colón-Carmona *et al.* 1999). In addition, to evaluate the effects of C10-HL on cell differentiation, we used *pAtEXP7:uidA*, the expression of which strongly correlates with initiation of root hair development (Cho & Cosgrove 2002). Strong primary root growth inhibition under 48  $\mu\text{M}$  or greater concentrations of C10-HL correlated with the loss of GUS expression in the primary root meristem of *pPRZ1:uidA* transgenic seedlings (Fig. 7a–f, arrows), and with the lack of cell divisions in the roots of *CycB1:uidA* plants (Fig. 7g–l). These effects were accompanied by an accelerated cell differentiation program revealed by *pAtEXP7:uidA* expression and root hair formation closer to the root tip at concentrations from 24 to 48  $\mu\text{M}$  of C10-HL, and by lateral root formation at greater concentrations of this compound (Fig. 7m–r). We also measured the length of *pPRZ1:uidA* expression zone. It was observed that in solvent-treated control seedlings, the meristem comprised around 350  $\mu\text{m}$ . Interestingly, C10-HL treatments showed a dose-dependent inhibition in the size of the meristem, in which concentrations greater than 48  $\mu\text{M}$  dramatically decreased the *pPRZ1:uidA* GUS expression region (Fig. 8). These results indicate that C10-HL inhibits primary root growth by affecting cell division in the meristem.

### The effect of C10-HL on root development is independent of auxin signalling

The impact of C10-HL on root hair development is similar to the effect of auxin when exogenously applied to *Arabidopsis* seedlings. Also, roots are shorter, root hairs develop closer to the root tip and lateral root formation is induced. To investigate whether C10-HL might or rather does not function via auxin-regulated processes, we conducted analyses of the expression of the GUS reporter gene in *Arabidopsis* transgenic seedlings harbouring the *DR5:uidA* gene construct. This reporter line has been useful in studying auxin-regulated gene expression in *Arabidopsis* (Ulmasov *et al.* 1997). Figure 9 shows histochemical staining for roots of transgenic *DR5:uidA* seedlings that were grown for 10 d in medium supplied with the solvent, indole-3-acetic acid (IAA) or C10-HL. In solvent-treated control seedlings, *DR5:uidA* expression is located primarily in the columella and quiescent centre at the root tip region (Fig. 9a). *DR5:uidA* seedlings grown in a concentration of 1  $\mu\text{M}$  IAA showed GUS activity throughout the primary root (Fig. 9b). In contrast, the pattern of GUS expression in *DR5:uidA* seedlings treated up to 192  $\mu\text{M}$  C10-HL remained similar (Fig. 9c,d) or decreased (Fig. 9e–g, arrows) in the primary root tip. The results from *DR5:uidA* reporter expression analyses suggest that C10-HL did not induce auxin-responsive gene expression in *Arabidopsis* seedlings.

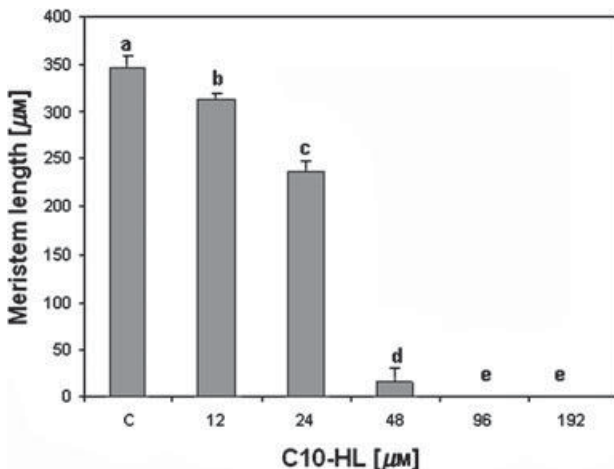
Several auxin-related mutants have been identified using screens for resistance to growth inhibitory amounts of auxin. To determine if C10-HL operates in a genetically defined auxin pathway, WT *Arabidopsis* seedlings (Col-0) and the auxin-related mutants *aux1-7*, *axr2* and *doc1* were evaluated in primary root growth response assays to IAA or C10-HL.



**Figure 7.** Effect of C10-HL on cell division and differentiation responsive gene expression. *pPRZ1::uidA*, *CyCB1::uidA* and *pAtEXP7::uidA* *Arabidopsis thaliana* seedlings were grown for 10 d on MS 0.2× medium supplemented with the indicated concentrations of C10-HL. Plants were stained for  $\beta$ -glucuronidase activity and cleared to show gene expression. Photographs show representative individuals from at least 15 stained plants. Arrows are used to indicate primary root tip.

Firstly, to confirm auxin resistance of these mutant lines, homozygous *aux1-7*, *axr2* and *doc1* mutant seedlings were screened for resistance to IAA based on primary root growth. In these experiments, *aux1-7* and *axr2* were resistant to the inhibition of primary root elongation by IAA when compared with WT seedlings (Supporting Information Fig. S1). These mutants also failed to form abundant root hairs at the root tip region in response to increasing IAA concentration in the medium, a phenotype associated with increased auxin resistance (Supporting Information Fig. S2).

Next we tested the effects of 48  $\mu$ M C10-HL on primary root growth and lateral root density (fully emerged lateral

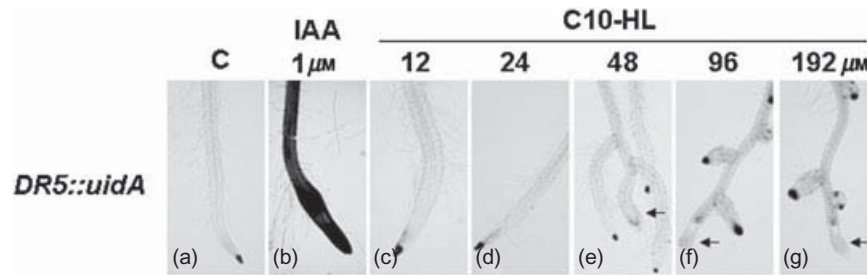


**Figure 8.** Effect of C10-HL on meristem length. *pPRZ1::uidA* *Arabidopsis thaliana* seedlings were grown for 10 d on MS 0.2× medium supplemented with the indicated concentrations of C10-HL. Plants were stained for  $\beta$ -glucuronidase activity and cleared to show gene expression. The expression zone of the marker was measured. Date points represent mean  $\pm$  SD ( $n = 30$ ). The experiment was replicated two times with similar results. Different letters indicate statistical differences at  $P < 0.05$ .

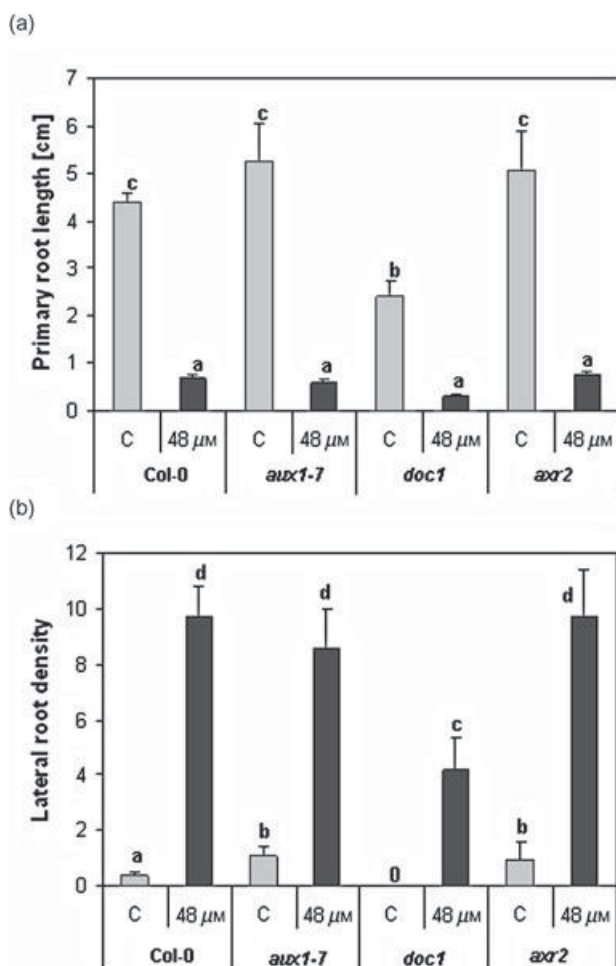
roots per centimetre of primary root) of the *aux1-7*, *doc1*, and *axr2* auxin-related mutants. As shown in Fig. 10, C10-HL treatment with 48  $\mu$ M caused a 90% inhibition in primary root growth in WT plants of the Col-0 ecotype (Fig. 10a). In media supplied with the solvent, *doc1* mutant seedlings showed a significantly reduced growth of the primary root, while *aux1-7* and *axr2* showed a modest yet not statistically significant increase in primary root growth. Despite this difference in primary root growth, when *aux1-7*, *doc1* and *axr2* seedlings were grown in medium supplied with 48  $\mu$ M C10-HL, an inhibition in primary root growth similar to that of WT plants could be observed (Fig. 10a). Our analysis of lateral root density in WT and mutant seedlings showed that lateral root density increases in WT, *aux1-7* and *axr2* to a similar extent (Fig. 10b). Even *doc1* seedlings, which failed to form lateral roots on control medium, were found to activate lateral root formation in response to C10-HL (Fig. 10b). Because C10-HL failed to induce auxin-regulated gene expression and *aux1-7*, *doc1* and *axr2* auxin-related mutants showed WT root developmental changes to C10-HL, we conclude that auxin may not be involved in *Arabidopsis* responses to C10-HL.

#### C10-HL did not rescue the root hair defective phenotype of the auxin-related *rhd6* *Arabidopsis* mutant

Auxin-related mutations have been found to alter root hair development (Parker *et al.* 2000). Of particular interest is the *rhd6* mutant, which is defective on root hair initiation and has been previously shown to be rescued by auxin (Masucci & Schiefelbein 1994). We used the *rhd6* mutant as a tool to probe further the mechanism of C10-HL action. We compared the root hair response of *Arabidopsis* WT seedlings and *rhd6* mutants with IAA and C10-HL at 7 d.a.g. As shown in Fig. 11, treatments with 1  $\mu$ M IAA stimulated root hair elongation and increased root hair



**Figure 9.** Effect of C10-HL on auxin-regulated gene expression. (a) Twelve hours of  $\beta$ -glucuronidase staining of *DR5::uidA* primary roots grown for 10 d on MS 0.2 $\times$  medium supplied with solvent; (b) with 1  $\mu$ M IAA; (c–g) or with the indicated concentrations of C10-HL. Photographs are representative individuals of at least 20 plants stained. The experiment was repeated three times with similar results. Arrows indicate the primary root tip.

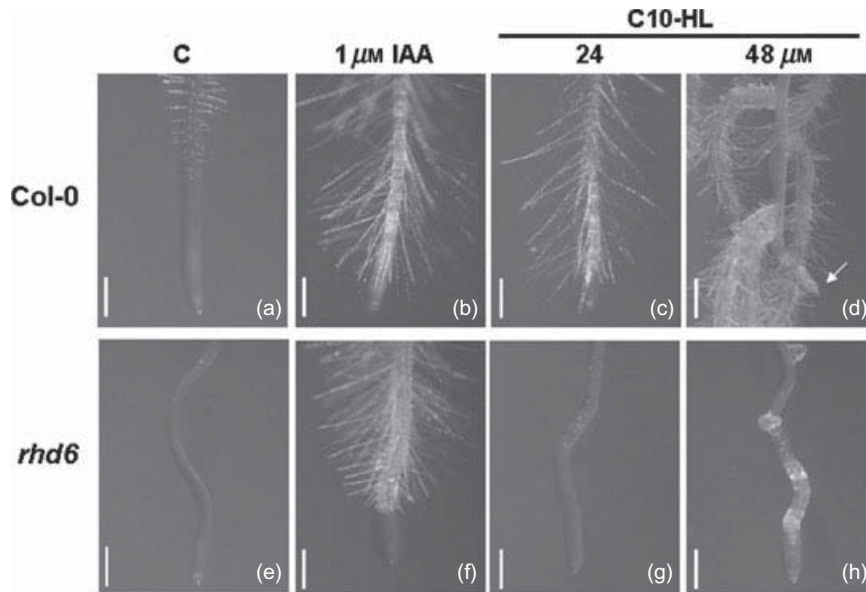


**Figure 10.** Effect of C10-HL on primary root growth and lateral root formation of wild-type (Col-0) and auxin-related mutants. *Arabidopsis thaliana* WT and *aux1-7*, *doc1* and *axr2* mutant seedlings were grown for 8 d on MS 0.2 $\times$  medium supplemented with the indicated concentration of C10-HL. Values shown represent the mean primary root length (a) and lateral root density (b) of 30 seedlings  $\pm$  SD. Different letters indicate statistical differences at  $P < 0.05$ . The experiment was repeated three times with similar results.

formation at the primary root tip region in *Arabidopsis* WT seedlings (Fig. 11a,b). A similar effect was observed with 24  $\mu$ M C10-HL (Fig. 11c), while a 48  $\mu$ M concentration of this compound elicited lateral root formation (Fig. 11d). *rhd6* mutant seedlings grown in medium without auxin were completely devoid of root hairs (Fig. 11e). As previously reported (Masucci & Schiefelbein 1994), IAA was found to rescue the *rhd6* root hair defective phenotype (Fig. 11f). The root hairs produced under IAA treatment exhibited normal growth and morphology, whereas treatment with 24 or 48  $\mu$ M C10-HL failed to induce root hairs in *rhd6* (Fig. 11g,h). These results imply that the application of C10-HL cannot suppress the root hair formation defects of *rhd6*, indicating an auxin-independent mechanism of action of this compound in the plant.

### Manipulation of *Arabidopsis* fatty acid amide hydrolase modifies sensitivity to C10-HL

Recently, a fatty acid amide hydrolase (FAAH) enzyme that rapidly hydrolyses NAEs, molecules structurally related to AHLs and alkamides (for the structure of NAE10:0, see Fig. 1), has been cloned from *Arabidopsis* (Wang *et al.* 2006). To investigate whether *AtFAAH* could play a role on *in vivo* metabolism of AHLs, we analysed the growth of *AtFAAH* mutant and overexpressor seedlings from lines previously reported by Wang *et al.* (2006), in response to C10-HL treatments. The relationship between NAEs and AHLs was revealed with *AtFAAH* overexpressor seedlings (OE2A), which were more tolerant to C10-HL primary root growth arrest, and *AtFAAH* mutants (*faah*; KO118043), which were hypersensitive to C10-HL (Fig. 12a). The differential sensitivity of FAAH overexpressors and mutants to C10-HL could be confirmed in bioassays comparing general plant development. It could be observed that seedlings of *AtFAAH* overexpressors displayed less sensitivity towards exogenous C10-HL in terms of shoot and root growth, and *faah* mutants were more sensitive than WT seedlings (Fig. 12b–j). These results suggest that manipulation of *AtFAAH* alters plant responses to a highly active AHL.



**Figure 11.** Effects of IAA and C10-HL on the *rhd6* mutant phenotype. (a) Wild-type Col-0 root with normal root hair formation. (b–d) Root hair formation in response to IAA or C10-HL treatments. (e) A typical *rhd6* mutant root showing a reduction in root hair formation. (f–h) Formation of root hairs in *rhd6* roots in response to IAA or C10-HL treatments. Notice the failure of C10-HL to induce root hairs in the mutant. Scale bars = 400  $\mu\text{m}$ .

## DISCUSSION

### AHLs modify *Arabidopsis* root system architecture

In this work, we show that AHLs, a class of bacteria-produced amino compound-containing lipids and structurally related to NAEs and alkamides (Figs 1 & 2), modify post-embryonic root development. AHLs are used by gram-negative bacteria to monitor population density, a term commonly referred to as quorum sensing (QS). QS was first described in *Vibrio fischeri*, a bacterial symbiotic species that provides its marine eukaryotic hosts with light. This bacterium produces AHL compounds that were shown to be freely diffusible across the bacterial membranes and accumulate in the cell environment. For bacteria, these AHLs act as cell density cues.

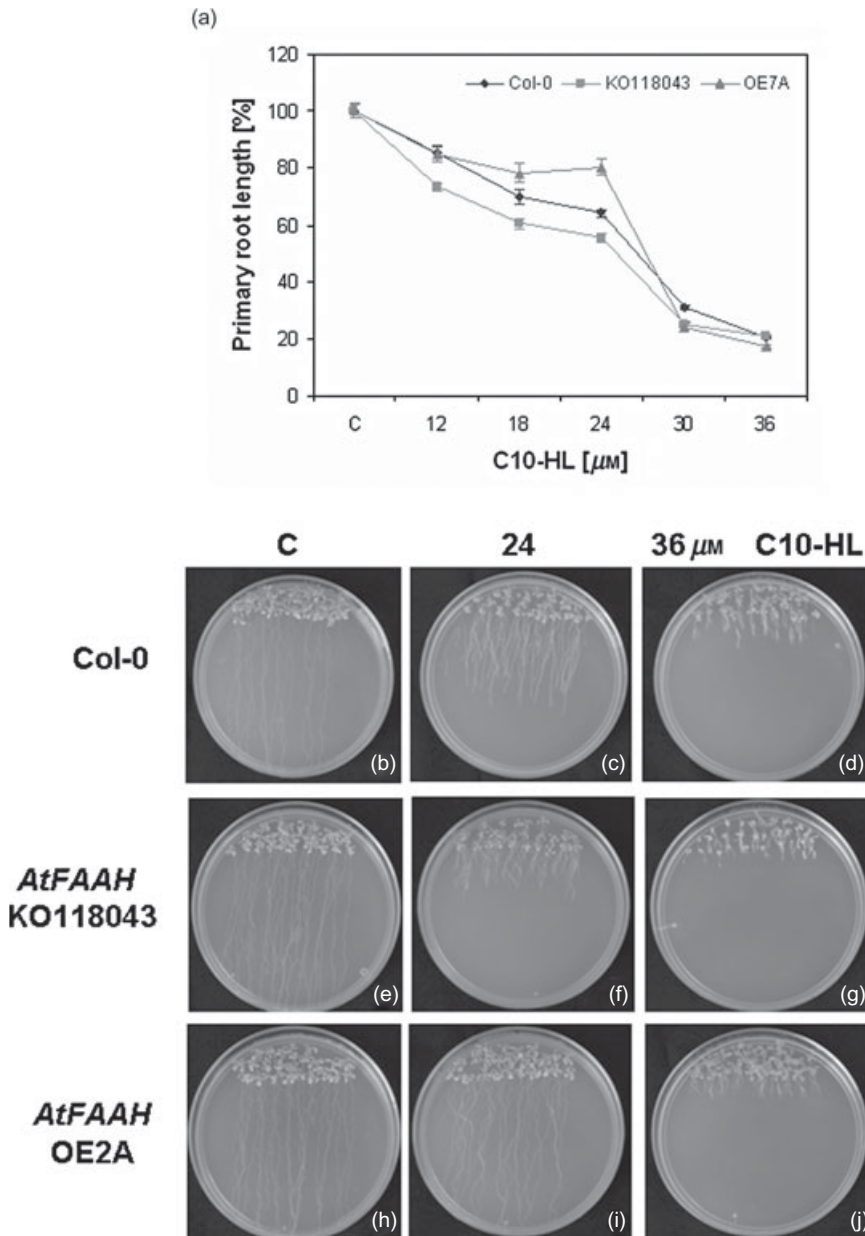
Medium (C8–C14)-chained AHL compounds showed a dose-dependent effect on root architecture, altering primary root growth, lateral root formation and root hair development (Figs 3–6). Particularly, C10-HL showed the greatest activity in inhibiting root growth and stimulating lateral root and root hair development (Figs 3–6). These results indicate that AHLs can alter root morphogenesis and provides a mechanism to explain the beneficial effects of certain AHL-producing rhizobacteria to promote plant growth, perhaps by modulating root development (Venturi 2006).

Several strains of *Pseudomonas* have been studied for their ability to colonize plant-related niches, such as the rhizosphere (e.g. *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*), where they can act as plant growth-promoting rhizobacteria by antagonizing plant-deleterious microorganisms and through the production of traits that directly influence plant disease resistance and growth (Venturi 2006). The rhizospheric *P. putida* plant beneficial strains WCS358 and IsoF produce 3-oxo-C<sub>12</sub>-AHL, whereas in the rhizosphere-colonizing biocontrol *P. fluorescens* strain F113, the production of three AHL

molecules has been reported, including C10-HL (Laue *et al.* 2000; Venturi 2006). Interestingly, C10-HL and C12-HL seem to be also produced in the nitrogen-fixing bacterial symbiont *Sinorhizobium meliloti* (Marketon *et al.* 2002; Teplitski *et al.* 2003). This information, along with the effects of C8-to-C12-HL on root development, opens new possibilities to identify plant growth-promoting bacterial strains based on AHL production.

Our results with cell division markers *pPRZ1:uidA* and *CycB1:uidA* show that primary root growth inhibition by C10-HL occurs by the alteration of cell division in the primary root meristem, probably during the G2–M phase transition of the cell cycle or at an earlier phase (Figs 7 & 8). These effects were accompanied by differentiation processes, including the formation of root hairs close to the root tip (Fig. 5). Rhizobacteria multiply to high densities on plant root surfaces where root exudates and root cell lysates provide nutrient sources. Sometimes, they exceed 100 times those densities found in the bulk soil (Campbell & Greaves 1990). The possibility is open that both the identity and the quantity of AHLs produced by rhizobacteria could modulate cell division in the meristem. Alterations in lateral root formation and root hair proliferation may provide a greater root surface area for bacterial colonization. In turn, increased absorptive surface by branched roots may increase water and nutrient uptake capacity of plants. We speculate that production of AHL compounds by plant-associated bacteria might benefit plant hosts by initiating or reinforcing symbiotic behaviours with bacterial partners.

Although the effects of C10-HL on root development are similar to those of auxins, our results show that the classic auxin-signalling pathway might be not involved in the root architectural responses of *Arabidopsis* seedlings to C10-HL. This hypothesis is mainly based on three lines of evidence: expression studies of the *DR5:GUS* marker (Fig. 9), the WT responses of the *aux1-7* and *axr2* auxin-related mutants to treatments with C10-HL (Fig. 10), and the



**Figure 12.** Effects of C10-HL on growth of *Arabidopsis thaliana* AtFAAH knockout and overexpressor lines. Col-0, AtFAAH KO118043 and AtFAAH OE2A seedlings were germinated and grown on 0.2 $\times$  MS-agar medium for 10 d. (a) Primary root length. (b–j) Morphology of plants. Representative photographs were taken of plants grown under the indicated C10-HL concentrations. Values shown represent the mean  $\pm$  SD ( $n = 30$ ). The experiment was repeated three times with similar results.

failure of this compound to elicit normal root hair formation in the *rhd6* *Arabidopsis* mutant (Fig. 11), indicating that the root developmental effects induced by C10-HL are unlikely mediated by the known auxin-signalling pathway.

#### ***Arabidopsis* fatty acid amide hydrolase manipulation modifies sensitivity to C10-HL**

Our results provide evidence that AHLs are signals with activity in plants. In bacteria, QS can be interfered by targeting the signal itself for destruction, preventing it from accumulating. Two different bacterial enzymes have been reported to have AHL-degrading activity: an AHL lactonase initially found in *Bacillus* sp. and an AHL acylase reported in several bacterial species (reviewed by Roche

*et al.* 2004). Recently, a fatty acid amide hydrolase, which hydrolyses NAEs was identified in *A. thaliana* and their levels manipulated by mutational and transgenic means (Wang *et al.* 2006). The availability of AtFAAH knockouts and overexpressor lines provided us with the basis to test the possibility that such AtFAAH activity may already act in AHL degradation. Our findings that manipulation of fatty acid amide hydrolase activity in *Arabidopsis* modifies sensitivity to C10-HL (Fig. 12), suggest a mechanism by which plants can metabolize bacterial AHLs. This result suggests that plants possess the enzymatic machinery to degrade these compounds.

For bacterial QS, the roles that AHL-degrading enzymes play in their natural ecological niche remain far from clear (Roche *et al.* 2004). Both for NAEs and AHLs, the signal

decay may have a function in the regulation of plant developmental processes or in plant recognition of bacterial symbionts or pathogens.

In animals, AHLs can act as virulence agents. In plant pathogenic bacteria, mutations affecting production of AHLs affect virulence (Taguchi *et al.* 2006; Hussain *et al.* 2008). Although the ultimate cause of this reduced virulence could be lack of QS in bacteria, our results indicate that in plants the role played by AHLs would be rather different. An important alternative to combat pathogens of plants is the alteration of virulence factors by interfering with QS. In this regard, the *aiiA* gene from *Bacillus* sp. encoding for an AHL lactonase has been cloned into tobacco and potato and found to confer resistance to infection by *Erwinia carotovora*, inhibiting the production of virulence determinants regulated by QS and allowing the host defences to effectively combat the infection (Dong *et al.* 2001). Future work is required in order to determine whether *AtFAAH* plays a role on QS signal modulation in addition to its suggested role in plant morphogenesis (Wang *et al.* 2006).

### AHLs: novel signals for plant–bacteria communication?

In recent years, evidence has accumulated that AHL molecules affect plant physiological responses. Mathesius *et al.* (2003) showed that *M. truncatula* roots respond to AHL exposure by changes in expression of over 150 genes, depending on AHL structure, concentration and time of exposure. AHL-mimicking compounds and AHL inhibitory activities were reported in exudates from pea seedlings (Gao *et al.* 2003; Teplitski *et al.* 2004). On the other hand, previous research showed that plants produce a wide range of alkamides and NAEs, which are active in modulating plant development (Chapman 2004; López-Bucio *et al.* 2006). This information provides a scenario in which small lipid amides could play a role in bacteria–plant interactions.

In *Vibrio harveyi*, an AHL called autoinducer-1 (AI-1) acts as a species-specific QS signal, which activates a two-component signalling system (Cao & Meighen 1989; Freeman & Bassler 1999; Timmen, Bassler & Jung 2006). Plants possess two-component signalling systems underlying the regulation of growth and development in response to cytokinins and ethylene (Mizuno 2005). In this regard, our recent research has revealed an important interaction between alkamides and cytokinin signalling. In such work, proliferative growth activity elicited by *N*-isobutyl decanamide on callus formation in leaves and lateral root formation in roots was decreased or was even absent in *Arabidopsis* mutants lacking one, two or three of the putative cytokinin receptors *CRE1*, *AHK2* and *AHK3* (López-Bucio *et al.* 2007). The triple cytokinin receptor mutant *cre1-12/ahk2-2/ahk3-3* was particularly insensitive to high alkamide concentrations in terms of developmental alterations, indicating that *N*-isobutyl decanamide requires, at least in part, a functional cytokinin-signalling pathway to control meristematic activity and differentiation processes.

Whether small lipid amides act as ligands of cytokinin receptors remains to be determined; however, the possibility is open that AHLs, NAEs and alkamides could regulate plant development by modulating two-component signalling systems.

### ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge Elison B. Blancaflor, Peter Doerner, Hyung Taeg Cho, Christian Luschnig, Tom Guilfoyle, Bonnie Bartel and John W. Schiefelbein for kindly providing us with seeds of *Arabidopsis* transgenic and mutant lines. This work was supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, Mexico, grant no. 43978), Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología (COECYT, Mexico, grant no. CB0702110-0) and Consejo de la Investigación Científica (UMSNH, México, grant no. CIC 2.26).

### REFERENCES

- Blancaflor E.B., Huo G. & Chapman K.D. (2003) Elevated levels of *N*-lauroylethanolamine, an endogenous constituent of desiccated seeds, disrupt normal root development in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Planta* **217**, 206–217.
- Camilli A. & Bassler B.L. (2006) Bacterial small-molecule signalling pathways. *Science* **311**, 1113–1116.
- Campbell R. & Greaves M.P. (1990) Anatomy and community structure of the rhizosphere. In *The Rhizosphere* (ed. J.M. Lynch), pp. 11–34. Wiley, Chichester, England.
- Campos-Cuevas J.C., Pelagio-Flores R., Raya-González J., Méndez-Bravo A., Ortiz-Castro R. & López-Bucio J. (2008) Tissue culture of *Arabidopsis thaliana* explants reveals a stimulatory effect of alkamides on adventitious root formation and nitric oxide accumulation. *Plant Science* **174**, 165–173.
- Cao J.G. & Meighen E.A. (1989) Purification and structural identification of an autoinducer for the luminescence system of *Vibrio harveyi*. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 21670–21676.
- Cha C., Gao P., Chen Y.C., Shaw P.D. & Farrand S.K. (1998) Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by Gram-negative plant-associated bacteria. *Molecular Plant Microbe Interactions* **11**, 1119–1129.
- Chapman K.D. (2004) The occurrence, metabolism and prospective functions of *N*-acylethanolamines in plants. *Progress in Lipid Research* **43**, 302–327.
- Cho H.T. & Cosgrove D.J. (2002) Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **14**, 3237–3253.
- Colón-Carmona A., You R., Haimovitch-Gal T. & Doerner P. (1999) Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *The Plant Journal* **20**, 503–508.
- D'Angelo-Picard C., Faure D., Penot I. & Dessaux Y. (2005) Diversity of *N*-acyl homoserine lactone-producing and -degrading bacteria in soil and tobacco rhizosphere. *Environmental Microbiology* **7**, 1796–1808.
- Daniels R., De Vos D.E., Desair J., Raedschelders G., Luyten E., Rosemeyer V., Verreth C., Schoeters E., Vanderleyden J. & Michels M. (2002) The *cin* quorum sensing locus of *Rhizobium etli* CNPAF512 affects growth and symbiotic nitrogen fixation. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 462–468.
- Dong Y.H., Wang L.H., Xu J.L., Zhang H.B., Zhang X.F. & Zhang L.H. (2001) Quenching quorum-sensing dependent bacterial

- infection by an *N*-acyl homoserine lactonase. *Nature* **411**, 813–817.
- Elasri M., Delorme S., Lemanceau P., Steward G., Laue B., Glickmann E., Oger P.M. & Dessaux Y. (2001) Acyl-homoserine lactone production is more common among plant-associated *Pseudomonas* spp. than among soilborne *Pseudomonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology* **7**, 1796–1808.
- Freeman J.A. & Bassler B.L. (1999) A genetic analysis of the function of LuxO, a two-component response regulator involved in quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Molecular Microbiology* **31**, 665–667.
- Gao M.M., Teplitski J.B., Robinson J.B. & Bauer W.D. (2003) Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing. *Molecular Plant Microbe Interactions* **16**, 827–834.
- Hussain M.B., Zhang H.B., Xu J.L., Liu Q., Jiang Z. & Zhang L.H. (2008) The acyl-homoserine lactone-type quorum-sensing system modulates cell motility and virulence of *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae*. *Journal of Bacteriology* **190**, 1045–1053.
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A. & Bevan M.W. (1987) GUS fusion:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* **6**, 3901–3907.
- Khmel I.A., Veselova M.A., Metlitskaya A.Z., Klein S., Lipasova V.A., Mayatskaya A.V. & Chernin L.S. (2002) Synthesis of signaling *N*-acyl-homoserine-lactone participating in quorum sensing regulation in rhizospheric and soil-borne bacteria *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Russian Journal of Genetics* **38**, 467–469.
- Laue B.E., Jiang Y., Chlabra S.R., Jacob S., Stewart G.S., Hardman A., Downie J.A., O'Gara F. & Williams P. (2000) The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin *N*-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl-homoserine lactone), via HdtS, a putative novel *N*-acyl-homoserine lactone synthase. *Microbiology* **146**, 2469–2480.
- Li H.M., Altschmied L. & Chory J. (1994) *Arabidopsis* mutants define downstream branches in the phototransduction pathway. *Genes and Development* **8**, 339–349.
- López-Bucio J., Acevedo-Hernández G., Ramírez-Chávez E., Molina-Torres J. & Herrera-Estrella L. (2006) Novel signals for plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 523–529.
- López-Bucio J., Millán-Godínez M., Méndez-Bravo A., Morquecho-Contreras A., Ramírez-Chávez E., Molina-Torres J., Pérez-Torres A., Higuchi M., Kakimoto T. & Herrera-Estrella L. (2007) Cytokinin receptors are involved in alkamide regulation of root and shoot development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **145**, 1703–1713.
- Marketon M.M., Gronquist M.R., Eberhard A. & González J.E. (2002) Characterization of the *Sinorhizobium meliloti* sinR/sinI locus and the production of novel *N*-acyl homoserine lactones. *Journal of Bacteriology* **184**, 5686–5695.
- Masucci J.D. & Schiefelbein J.W. (1994) The *rhod6* mutation of *Arabidopsis thaliana* alters root hair initiation through an auxin and ethylene associated process. *Plant Physiology* **106**, 1335–1346.
- Mathesius U., Mulders S., Gao M.S., Teplitski M., Cactano-Anolles G., Rolfe B.G. & Bauer W.D. (2003) Extensive and specific response of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 1444–1449.
- Mizuno T. (2005) Two-component phosphorelay signal transduction systems in plants; from hormone responses to circadian rhythms. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **69**, 2263–2276.
- Morquecho-Contreras A. & López-Bucio J. (2007) Cannabinoid-like signaling and other new developmental pathways in plants. *International Journal of Plant Developmental Biology* **1**, 34–41.
- Murashige T. & Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* **15**, 473–497.
- Parker J.S., Cavell A., Dolan L., Roberts K. & Grierson C. (2000) Genetic interactions during root hair morphogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **12**, 1961–1974.
- Parsek M.R., Val D.L., Hanzelka B.L., Cronan J.E. & Greenberg E.P. (1999) Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 4360–4365.
- Pearson J.P., Gray K.M., Passador L., Tucker K.D., Eberhard A., Iglewski B.H. & Greenberg E.P. (1994) Structure of the auto-inducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 197–201.
- Pickett F.B., Wilson A.K. & Estelle M. (1990) The *aux1* mutation of *Arabidopsis* confers both auxin and ethylene resistance. *Plant Physiology* **94**, 1462–1466.
- Raffa R.B., Iannuzzo J.R., Levine D.R., Saeid K.K., Schwartz R.C., Susic N.T., Terleckyi O.D. & Young J.M. (2004) Bacterial communication ('Quorum sensing') via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **312**, 417–422.
- Ramírez-Chávez E., López-Bucio J., Herrera-Estrella L. & Molina-Torres J. (2004) Alkamide isolated from plants promote growth and alter root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **134**, 1058–1068.
- Reading N.C. & Sperandio V. (2006) Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **254**, 1–11.
- Roche D.M., Byers J.T., Smith D., Glandsdorp F.G., Spring D.R. & Welch M. (2004) Communications blackout? Do *N*-acylhomoserine-lactone-degrading enzymes have any role in quorum sensing? *Microbiology* **150**, 2023–2028.
- Rosemeyer V., Michels J., Verreth C. & Vanderleyden J. (1998) *luxI*- and *luxR*-homologous genes of *Rhizobium etli* CNPAF512 contribute to synthesis of autoinducer molecules and nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Bacteriology* **180**, 815–821.
- Schuhegger R., Ihring A., Gantner S., et al. (2006) Induction of systemic resistance in tomato by *N*-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant, Cell & Environment* **29**, 909–918.
- Sieberer T., Hauser M.T., Seifert G.J. & Lusching C. (2003) *PRO-PORZI*, a putative *Arabidopsis* transcriptional adaptor protein, mediates auxin and cytokinin signals in the control of cell proliferation. *Current Biology* **13**, 837–842.
- Taga M.E. & Bassler B.L. (2003) Chemical communication among bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 14549–14554.
- Taguchi F., Ogawa Y., Takeuchi K., Suzuki T., Toyoda K., Shiraishi T. & Ichinose Y. (2006) A homologue of the 3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase III gene located in the glycosylation island of *Pseudomonas syringae* pv. *Tabaci* regulates virulence factors via *N*-acyl homoserine lactone and fatty acid synthesis. *Journal of Bacteriology* **188**, 8376–8384.
- Teplitski M., Robinson J.B. & Bauer W.D. (2000) Plants secrete substances that mimic bacterial *N*-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Molecular Plant Microbe Interactions* **13**, 637–648.
- Teplitski M., Eberhard A., Gronquist M.R., Gao M., Robinson J.B. & Bauer W. (2003) Chemical identification of *N*-acyl homoserine lactone quorum-sensing signals produced by *Sinorhizobium meliloti* strains in defined medium. *Archives of Microbiology* **180**, 494–497.
- Teplitski M., Chen H., Rajamani S., Gao M., Merighi M., Sayre T.,

- Robinson J.B., Rolfe B.G. & Bauer W.D. (2004) *Chlamydomonas reinhardtii* secretes compounds that mimic bacterial signals and interfere with quorum sensing regulation in bacteria. *Plant Physiology* **134**, 137–146.
- Timmen M., Bassler B.L. & Jung K. (2006) AI-1 influences the kinase activity but not the phosphatase activity of LuxN of *Vibrio harveyi*. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 24398–24404.
- Timpte C., Wilson A.K. & Estelle M. (1994) The *axr2* mutation of *Arabidopsis thaliana* is a gain-of-function mutation that disrupts an early step in auxin response. *Genetics* **138**, 1239–1249.
- Ulmasov T., Murfett J., Hagen T. & Guilfoyle T. (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *The Plant Cell* **9**, 1963–1971.
- Vannini A., Volpari C., Gargioli C., Muraglia E., Cortese R., De Francesco R., Neddermann P. & Di Marco E. (2002) The crystal structure of the quorum sensing protein TraR bound to its autoinducer and target DNA. *EMBO Journal* **21**, 4393–4401.
- Venturi V. (2006) Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiology Reviews* **30**, 274–291.
- Wang Y.S., Shrestha R., Kilaru A., Wiant W., Venables B.J., Chapman K.D. & Blancaflor E.B. (2006) Manipulation of *Arabidopsis* fatty acid amide hydrolase expression modifies plant growth and sensitivity to *N*-acylethanolamines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 12197–12202.
- Waters C.M. & Bassler B.L. (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cellular and Developmental Biology* **21**, 319–346.
- Zhang H., Jennings A., Barlow P.W. & Forde B.G. (1999) Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 6529–6534.
- Zheng H., Zhong Z., Lai X., Chen W.X., Li S. & Zhu J. (2006) A *luxR/luxI*-type quorum sensing system in a plant bacterium *Mesorhizobium tianshanense*, controls symbiotic nodulation. *Journal of Bacteriology* **188**, 1943–1949.
- Zhu J., Beaber J.W., More M.I., Fuqua C., Eberhard A. & Winans S.C. (1998) Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology* **180**, 5398–5405.

Received 5 July 2008; accepted for publication 9 July 2008

## SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Figure S1.** Effect of IAA on primary root growth of wild-type (Col-0) and auxin-related mutants. *Arabidopsis thaliana* WT, *aux1-7*, *doc1* and *axr2* mutant seedlings were grown for 8 d on MS0.2× medium supplemented with the indicated concentration of IAA. Values shown represent the mean primary root length (a) and relative (%) primary root growth (b) of 30 seedlings ±SD. The experiment was repeated two times with similar results.

**Figure S2.** Morphology of root tips of wild-type (Col-0) and auxin-related *aux1-7* and *axr2* mutants exposed to varied concentrations of IAA. Seedlings were grown for 7 d and photographed using a dissecting microscope. Scale bars = 400 μm.

Please note: Blackwell Publishing are not responsible for the content or functionality of any supplementary materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

**Chapter title:**

Amino compound-containing lipids: A novel class of signals regulating plant development

**Authors:**

Randy Ortiz-Castro, Alfonso Méndez-Bravo, and José López-Bucio

**Affiliation:**

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

**Corresponding author:**

José López-Bucio. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Av. Francisco J. Múgica S/N, Edificio B3, Ciudad Universitaria, CP 58030 Morelia, Michoacán, México. Telephone: 52 (443) 3265788 ext. 122; Fax: 52 (443) 3265788 ext. 103  
e-mail: [jbucio@zeus.umich.mx](mailto:jbucio@zeus.umich.mx)

## **Abstract**

Plant growth and development are driven by the integration of a vast number of signals including volatile compounds, small organic molecules, peptides, steroids and lipids. Among these, amino containing signaling lipids such as alkamides and *N*-acyl ethanolamines (NAEs) have emerged as important regulators of cellular processes, including cell proliferation, growth and differentiation. Manipulation in the level of alkamides and NAEs in plants by pharmacological, mutational and transgenic approaches affect morphogenetic processes including seed germination and post-embryonic shoot and root development. Further evidence for a role of these compounds in regulating physiological processes is supported by their occurrence in a wide range of plant species, their selective accumulation and rapid metabolism in response to developmental transitions and by the recent identification of the enzymes that metabolize NAEs. Moreover, signal transduction cascades involving abscisic acid, cytokinins and nitric oxide have been found to interact with alkamides and NAEs, highlighting the importance of crosstalk between these novel small lipids and other classic signals for plant growth regulation. The discovery that *N*-acyl homoserine lactones (AHLs), a class of bacterial quorum-sensing signals structurally related to alkamides, can be perceived by plants, opens the possibility that acylamides could be also involved in plant-bacterial interactions.

## **Contents**

- (1). Introduction
- (2). Biosynthesis and metabolism of acylamides in plants
- (3). Distribution of acylamides
- (4). Role of NAEs and alkamides in plant development
  - (4.1). Seed germination
  - (4.2). Shoot development
  - (4.3). Root development
- (5). Signals interacting with NAEs and alkamides
  - (5.1). Auxins
  - (5.2). Cytokinins
  - (5.3). Nitric oxide
- (6). Cellular alterations underlying plants responses to NAEs and alkamides: cell cycle progression and microtubule stability
  - (6.1). Cell cycle progression
  - (6.2). Microtubule stability
- (7). AHLs: inter-kingdom signals for plant-bacterial interactions
- (8). Concluding remarks
- (9). References

## **(1). Introduction**

Plants produce compounds of different chemical identity that mediate a range of cellular functions including volatiles such as ethylene and jasmonate, small organic hormones such as auxins, cytokinins, gibberellins and abscisic acid, brassinosteroids, and lipids (Weyers and Paterson 2001).

Lipids have long been recognized as signaling molecules that have the capacity to trigger profound physiological responses. In animals, ceramides and sphingosines are lipids that have pro-apoptotic and antiproliferative actions (Wymann and Schneider 2008). In plants, ceramides, sphingosines and phosphatidic acid are involved in mediating plant growth, development and responses to biotic and abiotic stimuli, and their production is regulated by a key set of lipid modifying enzymes, such as phospholipases, lipid kinases, and/or phosphatases (Wang 2004; Worrall et al. 2003). Studies on the downstream targets and modes of action of signaling lipids are still in their early stages.

Alkamides and *N*-acyl ethanolamines (NAEs) comprise a group of bioactive acylamides with varied acyl chain length and saturation grade (Chapman 2004; López-Bucio et al. 2006; Morquecho-Contreras and López-Bucio 2007). In mammals, the metabolism of NAEs is part of the endocannabinoid signaling pathway wherein anandamide (NAE 20:4) acts as an endogenous agonist of G protein-coupled cannabinoid receptors, which in turn regulate a wide array of physiological and behavioral processes including modulation of neurotransmission in the central nervous system (Wilson and Nicoll 2002), synchronization of embryo development (Paria and Dey 2000) and vasodilation (Kunos et al. 2000). Recently, additional cellular targets of NAEs have been discovered, including ion channels (Movahed et al. 2005; Oz et al. 2005) and transcription factors (LoVerme et al. 2006).

Alkamides comprise over 200 related compounds widely distributed in plants from lichens to angiosperms. An important role for these compounds in plant morphogenesis has been inferred from pharmacological application and mutant analysis in the model plant *Arabidopsis thaliana* (López-Bucio et al. 2006). In the past 5 years, accumulated evidence points to a role of NAEs and alkamides in diverse physiological processes including seed germination and regulation of plant architecture. In this chapter, the recent information on NAEs and alkamides in plants is reviewed in the context of their occurrence, metabolism, interactions with other plant growth regulators and functions in

plant development. Structurally related compounds from bacteria are the *N*-acyl homoserine lactones (AHLs). These compounds participate in cell-to-cell signaling between bacteria, usually referred to as quorum-sensing. We propose that small lipid signaling based on NAEs, alkamides and AHLs might be part of an ancestral inter-kingdom communication system between plants and their associated bacteria to regulate the symbiotic and/or pathogenic behaviours.

## **(2). Biosynthesis and metabolism of acylamides in plants**

Most organisms are known to contain in their inner and outer membranes amphipatic lipids based on one or two amino acids linked to a fatty acid through an amide bond. Three classes of compounds are beginning to be considered as plant signals based on their potent activities and strong morphogenic effects, NAEs, alkamides and AHLs (Table 1). NAEs represent compounds with aminoalcohol linked as an amide to the fatty acid. They are likely produced from the hydrolysis of *N*-acyl phosphatidylethanolamines (NAPEs), a minor constituent of cell membranes by phospholipase D. NAPEs occur naturally in diverse biological systems. For example, NAPEs accumulate during cell injury or stress in animal tissues and dehydration in plant seeds (Hansen et al. 2002; Chapman 2004). The conformation of NAPEs in a lipid bilayer and their interaction with other lipids has been analyzed by spectroscopy studies (Lafrance et al. 1990; Swamy et al. 2000). For long-chain NAPEs, the *N*-acyl moiety is bent and buried in the hydrophobic phase of the phospholipid bilayer. By contrast, for short-chain NAPEs, the *N*-acyl chain remains at the level of the glycerol backbone, exposed to the aqueous milieu. NAPEs are the source of signaling NAEs, including anandamide (*N*-arachidonoyl ethanolamide) (Table 1), which binds to cannabinoid receptors CB1 and CB2 and regulates important physiological processes in animals. The molecular determinants of the activity of the different types of phospholipases have been the subject of several structural studies (Caramelo et al. 2003; Okamoto et al. 2004). A novel NAPE-hydrolyzing phospholipase D (PLD) was cloned from mammals, which exhibited specificity toward NAPE substrates but not to other common membrane phospholipids, indicating that this is one of the enzymes responsible for converting NAPE to NAE in vivo (Okamoto et al. 2004). Recent reports have shown that NAEs may be generated from NAPEs via phospholipase A (Simon and Cravatt 2006) or phospholipase C (Liu et al. 2006). In plants, PLD- $\beta$  and  $-\gamma$  catalize the

formation of NAEs from NAPEs in vitro (Pappan et al. 1998). PLDs from plants, animals and fungi share similarities in structure and catalytic mechanisms. However, the plant PLD family is much more complex than those of other organisms, for example, 12 PLD genes are present in *Arabidopsis*, whereas two PLD genes are in mammals and one in *Saccharomyces cerevisiae* (Wang 2004). This complexity might account for the critical role of PLD products phosphatidic acid and NAEs in plant signaling.

The enzymatic machinery for the degradation of NAEs is conserved between animals and plants. For example, an enzyme that rapidly hydrolyzes NAEs into ethanolamine and their corresponding fatty acids has been cloned from mammals. This enzyme, called fatty acid amide hydrolase (FAAH), belongs to a group of proteins containing a conserved amidase sequence (Shresta et al. 2003; Shresta et al. 2006). The amidase region of these proteins consists of about 125 amino acids. There is 18.5% identity between the *Arabidopsis* FAAH (*AtFAAH*) and rat FAAH when compared over the entire length of the proteins, whereas there is 37% identity within the amidase region. Functional homologues of *AtFAAH* were also identified in *Oriza sativa* and *Medicago truncatula*, supporting a common mechanism for the regulation of NAE hydrolysis in diverse plant species (Shresta et al. 2006). The possibility that a breakdown product of ceramide or other sphingolipids may result in metabolites similar to NAEs or alkamides has been considered (Ramírez-Chávez et al. 2004). Interestingly, a fatty acid amidase was recently identified as an alternate enzyme for NAE hydrolysis. This enzyme belongs to the choloylglycine hydrolase family with structural and functional similarity to acid ceramidase (Tsuboi et al. 2005). The combined action of fatty acid hydrolases *AtFAAH* and ceramidases may account for the efficient metabolism of NAEs in different plant tissues.

### **(3). Distribution of acylamides**

NAEs have been quantified in seeds of some higher plants, including cotton, corn, *Arabidopsis*, soybean tomato and pea. The total NAE content varied among plant species from 500 to 1600 ng/g in fresh weight, and acyl chain length ranging from 12 to 20 carbon atoms (Chapman 2004). NAEs containing 16C and 18C were the most abundant compounds in dry seeds. Total NAE concentrations drop drastically following seed imbibition and during germination. In desiccated *Arabidopsis* seeds, total NAE content was of 2000 ng/g, and this concentration declined to 500ng/g 96h after sowing

(Wang et al. 2006). The elevated levels of NAEs in seeds point to the possibility that these lipids may function in processes relevant to seed or seedling development.

The vegetative tissues of plants have lower NAE contents than seeds and their NAE profile also differs from that in seeds in that NAE 12:0 and NAE 14:0 appear to predominate (Chapman 2004). There is evidence that in stem and leaves medium chain NAEs are synthesized on demand rather than stored. For instance, in tobacco leaves the concentration of NAE 14:0 is of approximately 5 ng/g in a fresh weight basis. Interestingly, a 10 min exposure to nanomolar concentrations of two protein elicitors, xylanase and cryptogein, caused a 10 and a 50-fold increase in NAE 12:0 and NAE 14:0, respectively (Tripathy et al. 1999). Exogenous application of synthetic NAE 14:0 at concentration of 1  $\mu$ M induced a 4-fold increase in phenylalanine ammonia lyase (PAL) expression in a manner similar to that elicited by xylanase and cryptogein in both cell suspensions and leaves of tobacco (Tripathy et al. 1999). These results suggest medium-chain NAEs may participate in the signal transduction events leading to plant defense responses.

Alkamides comprise over 200 related compounds that have been found in as many as 10 plant families: Aristolochiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Convolvulaceae, Euphorbiaceae, Menispermaceae, Piperaceae, Poaceae, Rutaceae, and Solanaceae. Species containing high levels of alkamides are found in the Asteraceae, Piperaceae, and Rutaceae (Christensen and Lam 1991; Kashiwada et al. 1997; Laurerio-Rosario et al. 1996). Certain alkamides such as pellitorin have been described as allelochemicals. Pellitorin is naturally present in *Stauranthus perforatus*, a rutaceous tree, which exerts a strong allelochemical effect on the growth of weeds (Anaya et al. 2005). Pellitorin in concentration of 100 mg/ml supplied to the culture medium in vitro caused a 45 and 80% inhibition in root growth of *Amaranthus hypochondriacus* and *Echinochloa crusgalli*, respectively. In a greenhouse experiment, the decomposition of leaves and roots of *S. perforatus* incorporated as green manures (2%) to the soil had a significant inhibitory effect in the growth of weeds. The allelopathic action of decomposition of plant tissues was comparable to that of DPCA (dimethyl tetrachloroterephthalate), a commercial herbicide (Anaya et al. 2005). Based on the above presented information, it is tempting to speculate that pellitorin production by *S. perforatus* might represent a strategy for competition.

Alkamide accumulating plants can occur in different plant families. Certain medicinal plants such as *Echinacea angustifolia*, *Echinacea purpurea* and *Heliopsis longipes* have

been used in the past and present by different civilizations. These plants accumulate alkaloids in plant tissues (Bauer and Reminger 1989; Molina-Torres et al. 1996). In *H. longipes* a traditional herb endemic of central México, the alkaloid affinin accumulates especially in roots, where it is present in as high as 1% (w/w) on a fresh weight basis (Molina-Torres 1996). In *E. purpurea*, alkaloids accumulate preferentially in flower heads and in roots. Their levels are low at the beginning of vegetative growth and increase at the flowering stage (Letchamo et al. 1999; Qu et al. 2005). For total alkaloids, concentrations varied from 5 to 27.6 mg/g in roots and from 0.22 to 5.3 mg/g in vegetative tissues (Qu et al. 2005). The reason why certain plants accumulate alkaloids is not clear, however, it could provide an advantage for competition acting as allelochemicals as in the case of pellitorin, or might represent a mechanism to adjust their growth and development, as their importance in cellular processes is increasingly being appreciated.

#### **(4). Role of NAEs and alkaloids in plant development**

The plant kingdom is a vast storehouse of chemical substances manufactured and used by plants as defenses against viruses, bacteria, fungi and insects. Physiological and ecological constraints play key roles in plant growth patterns. Plant activity at the cellular level can be classified in general terms as growth (cell division and enlargement) or differentiation (chemical and morphological changes leading to cell specialization). Some plants provision seeds with high concentrations of secondary metabolites, possibly to protect the seed and the rapid growing seedling before it has developed the capacity to synthesize significant quantities on its own (Herms and Mattson 1992). Growth processes demand particularly high levels of limited plant resources. They are highly dependent on protein synthesis for the manufacture of photosynthetic, biosynthetic and regulatory enzymes, as well as for structural protein. The production of secondary metabolites competes directly with protein synthesis, and consequently with growth. It is thus not surprising that plants exposed to pathogens or to sub-lethal abiotic stress conditions exhibit a broad range of morphogenic responses (Potters et al. 2007). Despite the diversity of phenotypes, a generic stress-induced growth response can be recognized that appears to be carefully orchestrated and comprises three components: a) inhibition of cell elongation, b) localized stimulation of cell division and c) alterations in cell differentiation (Herms and Mattson 1992; Potters

et al. 2007). Although the stress-induced developmental responses seem to be part of a general acclimation strategy, whereby plant growth is redirected to diminish stress exposure, little is known about the molecular mechanism underlying this response. Altered phytohormone synthesis, transport and/or metabolism could be part of the physiological component of plant growth modulation. Five major hormones have been identified: auxins, abscisic acid, cytokinins, ethylene and gibberellin. Additional signals are in the course to be added to this list, including brassinosteroids and certain lipids such as sphingolipids and phosphatidic acid (Weyers and Paterson 2001; Wang 2004). In our studies we have identified a new class of regulatory molecules in plants, the alkamides, which are structurally similar to NAEs. The alkamides were initially identified for their similarity to ceramides, a group of key signals in yeast and animals (Ramírez-Chávez et al. 2004; López-Bucio et al. 2006). Until recently, NAEs and alkamides had been considered as a class of secondary metabolites, which accumulated in particular plant species and tissues. Research using *Arabidopsis thaliana* suggested that they might have a pivotal role in integrating environmental signals into developmental transitions. Alkamides and NAEs appear to deliver a message regulating a particular plant function. The functions include germination and alteration of growth and differentiation in the course of development.

#### **(4.1). Seed germination**

Seed dormancy and germination are under the control of phytohormones and their signaling pathways. Genetic analysis of seed germination in *Arabidopsis* has revealed that gibberellic acid (GA) and abscisic acid (ABA) are crucial regulators (Finch-Savage and Leubner-Metzger 2006). GA is widely regarded as a growth-promoting compound that positively regulates germination. ABA, in contrast, has historically been considered to function as a germination inhibitor (Razem et al. 2006).

The notion that NAEs plays a role in seed germination is supported by their accumulation in desiccated seeds of a variety of plant species, but during imbibition and germination, NAE levels decrease significantly and remain at low concentrations during subsequent seedling growth (Venables et al. 2005). These observations suggest that the rapid metabolism of NAEs is a prerequisite for germination. In fact, exogenous application of NAE 10:0, and the alkamides affinin and *N*-isobutyl decanamide regulated in a dose-response manner the germination of seeds from different plant

species, with low concentrations (nm range) promoting germination and high concentrations (mM range) drastically inhibiting germination (Morquecho-Contreras and López-Bucio, unpublished).

Important information about the *in vivo* role of NAEs in germination came from the manipulated expression of *AtFAAH*, an enzyme that hydrolyzes NAEs into ethanolamine and free fatty acids, in *Arabidopsis thaliana*. In this way, Wang and coworkers (2006) reported that *AtFAAH* expression and FAAH catalytic activity increased during seed germination and seedling growth, consistent with the timing of NAE depletion. Moreover, the authors identified T-DNA mutants of *A. thaliana* and generated transgenic plants overexpressing *AtFAAH*. They found that seeds of *AtFAAH* mutants had elevated levels of endogenous NAEs, and seedling growth was hypersensitive to exogenously applied NAE 12:0. In contrast, seeds and seedlings of *AtFAAH* overexpressing plants had lower endogenous NAE content and seedlings were less sensitive to exogenous NAE (Wang et al. 2006). Intriguingly, no phenotype on germination was reported for *AtFAAH* mutants or overexpressors, indicating that additional enzymes are likely involved in NAE metabolism with potential redundant functions.

The interaction between NAEs and abscisic acid in regulating seed germination was recently shown by Teaster and coworkers (2007). These authors showed that NAE and abscisic acid levels were depleted during seed germination. Combined application of low levels of ABA and NAEs produced a more dramatic reduction in germination than either compound alone. Transcript profiling and gene expression studies in NAE-treated seedlings revealed elevated transcripts for a number of ABA-responsive genes and genes typically enriched in desiccated seeds (Teaster et al. 2007). These data suggest that NAEs act in concert with ABA to regulate seed germination, whether alkamides interact with ABA or GA to affect germination remains to be determined.

#### **(4.2). Shoot development**

The shoot represents the above-ground part of higher plants. It is composed of the stem with its branches, and axillary meristems. The stem raises foliage and flowers for optimal light exposure and seed dispersal. The ultimate source of all above-ground organs is a small population of stem cells in the central zone of the shoot apical meristem (Laux and Mayer 1998). Leaf initiation at the shoot apical meristem involves

a balance between cell proliferation and commitment to make primordia. *Arabidopsis* has a typical simple leaf, which consists of a petiole and a blade (Fig. 1a). The presence of a petiole is presumed to be important in the effective capture of light by ensuring that the leaf blades do not overlap. To produce this leaf shape, the cells on the proximal side of the leaf differentiate into petioles without producing blades or other organs (Ha et al. 2003). Two of the clearest effects of *N*-isobutyl decanamide on shoot development were the ectopic induction of outgrowths along the leaf petioles and the formation of callus-like structures on blades (Fig. 1b and c). The outgrowths formed on petioles resembled a leaf blade in that they showed the presence of trichomes, a class of differentiated epidermal cells commonly present in blades but not in petioles (Fig. 1d-f, arrows). In addition, *N*-isobutyl decanamide treatments were found to induce the production of callus-like structures on leaves (Fig. 1g-i). These structures sustained growth as plant development progressed and expressed genes indicative of proliferative activity such as cyclin B1, which is involved in cell cycle transitions (López-Bucio et al. 2007). These results suggest that in plants treated with the alkamide, leaf cells do not exit from the cell cycle with normal developmental timing, resulting in ectopic cell divisions. The fact that petiole cells do not undergo correct developmental specification and are diverted toward other developmental fates such as blade formation indicate that the alkamide is also capable of reprogramming petiole cells to initiate the de novo formation of organs in differentiated cells.

#### **(4.3). Root development**

Roots perform the essential activities of providing water, nutrients and physical support to the plant. The primary root originates in the embryo and produces many lateral roots during the lifetime of a plant, and each of these will produce more lateral roots. The quantity and placement of these determines the architecture of the root system, and this in turn plays a major role in determining whether a plant will survive in a particular climate or environment (Malamy and Benfey 1997; Casimiro et al. 2003). During the post-embryonic development of plants, new axes of growth emerge from shoot tissues through adventitious organogenesis, this is particularly important in crops such as maize, in which adventitious root formation provides a flexible way for plants to alter their form and resource allocation in response to environmental changes or after injury. While lateral roots typically form from the primary root pericycle, adventitious roots

form naturally from stem tissue. Lateral and adventitious root formation is a complex process affected by multiple endogenous factors, including phytohormones such as auxin, and environmental factors such as light and wounding (Casimiro et al. 2003).

Different reports indicate that NAEs and alkamides may play an important role in regulating root architecture with stimulating or repressing effects in biomass production depending on the compound, the concentration in the medium and conditions of culture. Micromolar concentrations of NAE 12:0 and NAE 18:2 supplied to *A. thaliana* seedlings grown in agar plates inhibited primary root elongation and disrupted normal cell growth in a dose-dependent and selective manner (Blancaflor et al. 2003; Motes et al. 2005; Wang et al. 2006). Kanbe and coworkers (1993) showed that amidinenin, a non-substituted alkamide isolated from the actinomycete *Amycolatopsis* sp., promoted the growth of rice (*Oriza sativa*) plants at concentrations of 0.6 and 1.8 x 10<sup>-5</sup> M and inhibited growth at concentration of 6 x 10<sup>-5</sup> M. Similarly, the alkamides affinin and *N*-isobutyl decanamide showed a dose-dependent effect in biomass production in *A. thaliana*, which correlated with primary root growth inhibition and enhanced lateral root proliferation (Ramírez-Chávez et al. 2004).

As a first step in exploring the structure-activity relationships of NAEs and alkamides, López-Bucio and coworkers (2007) quantified the root growth response of *Arabidopsis* seedlings to natural and synthetic compounds. From a group of similar chain length NAEs and alkamides, they identified *N*-isobutyl decanamide, a C10 saturated alkamide that is naturally produced in *Acmella radicans* (Ríos-Chávez et al. 2003) and *Cissampelos glaberrima* (Laurerio-Rosario et al. 1996), as the most active compound in inhibiting primary root growth and stimulating lateral root formation. The plant regenerative properties of *N*-isobutyl decanamide was further tested in *Arabidopsis thaliana* explants that were treated with varied concentrations of this compound. Cultivation of stem explants that harbored the shoot apical meristem on a nutrient rich-medium lacking alkamides resulted in formation of plants with fully developed shoot and root systems. On the contrary, explants obtained from stems or primary roots resulted in development of adventitious roots in stem explants or lateral roots in explants from roots (Campos-Cuevas et al. 2008). *N*-isobutyl decanamide treatments were found to induce adventitious root formation both in explants or intact *Arabidopsis thaliana* seedlings (Fig. 1j-l). This effect was accompanied with the differentiation of the primary root meristem followed by root hair and lateral root formation close to the primary root tip (Fig. 1m-p). The stimulation of root branching by *N*-isobutyl

decanamide was related to a general plant growth promoting effect of this compound in plants regenerated from explants, indicating a potential use of alkamides in propagation of plants and/or explants by tissue culture means (Campos-Cuevas et al. 2008).

## **(5). Signals interacting with NAEs and alkamides**

### **(5.1). Auxins**

The effects of NAEs and alkamides in root and shoot development suggest that phytohormones could be involved in the responses of plants to these compounds. Auxins are involved in altering primary root growth and in promoting lateral and adventitious root formation (Woodward and Bartel 2005). Several lines of evidence indicate that the effects of alkamides on the root system architecture are independent of auxin signaling. First, the examination of primary root growth of auxin-resistant mutants *aux1-7*, *eir1* and *axr4-2* in response to high affinin concentrations revealed a primary root growth inhibition similar to WT plants (Ramírez-Chávez et al. 2004). Second, affinin and *N*-isobutyl decanamide were able to induce high numbers of adventitious roots in shoot explants from auxin-resistant mutants (Campos-Cuevas et al. 2008), indicating a normal cell proliferating response. Third, affinin and *N*-isobutyl decanamide failed to activate the expression of the auxin-inducible gene markers *DR5:uidA* and *BA3:uidA* in primary roots and during adventitious root formation in explants (Ramírez-Chávez et al. 2004; Campos-Cuevas et al. 2008). This information suggests that alkamides regulate plant development by an auxin independent signaling mechanism.

### **(5.2). Cytokinins**

Cytokinins are purine derivatives that promote and maintain plant cell division in cultures and are also involved in various differentiation processes including shoot formation, primary root growth and callus formation (Howell et al. 2003). Three different cytokinin receptors have been described, which activate gene expression in a cytokinin-dependent manner. These receptors are sensor histidine kinases, encoded by the *cre1/ahk4/wol*, *ahk2*, and *ahk3* genes in *Arabidopsis* (Kakimoto et al. 2003).

The possibility that alkamides could regulate organ development in roots and shoots

interacting with cytokinin signaling was recently investigated by evaluating the inducibility of cytokinin gene expression markers in response to *N*-isobutyl decanamide and testing the responses of single, double and triple mutant combinations for the three known cytokinin receptors to this alkamide (López-Bucio et al. 2007). Interestingly, the ectopic formation of blades on petioles and callus-like structures on leaves was related to an enhanced expression of *ARR5:uidA*, a cytokinin-inducible gene marker in shoots. The triple cytokinin receptor mutant *cre1-12/ahk2-2/ahk3-3* was insensitive to *N*-isobutyl decanamide treatment, showing absence of blades on petioles and callus-like structures in leaves under elevated levels of this alkamide. These results suggest that alkamides interact with cytokinin signaling to control cell division and differentiation processes during plant development. The molecular mechanisms underlying this interaction are currently under investigation.

### **(5.3). Nitric oxide**

Nitric oxide (NO) is a critical signaling molecule in several vital processes in both mammals and plants. Because of its gaseous nature, it is a highly permeable molecule that freely diffuses through biological membranes. NO is synthesized from the amino acid L-arginine. In plant systems, it can be produced principally by two routes: a) from L-arginine by a nitric oxide synthase-like protein, or b) from nitrite via nitrate reductase and nitrite reductase enzyme action. Once synthesized and released, NO acts as mediator of developmental processes (Neill et al. 2003). Experimental data indicate signaling roles for NO in processes such as xylem differentiation, programmed cell death and lateral and adventitious root formation (Lamattina et al. 2003).

The relationship between NO and alkamides was recently investigated in *A. thaliana* shoot explants (Campos-Cuevas et al. 2008). *N*-isobutyl decanamide treatment was found to induce NO accumulation in different stages of development of the explants. NO was detected by confocal microscopic analysis in the sites of adventitious root formation and its level increased with alkamide treatment. Whether NO mediates the adventitious root response and other morphogenetic responses of plants to alkamides remain to be investigated.

## **(6). Cellular alterations underlying plant responses to NAEs and alkamides: cell cycle progression and microtubule stability**

The molecular mechanisms underlying NAE and alkamide responses comprises parallel inhibition of cell elongation and localized stimulation of cell division, these processes are likely to function as focal points in its regulation of plant architecture (Blancaflor et al. 2003; Ramírez-Chávez et al. 2004).

### **(6.1). Cell cycle progression**

Cell division activity in plants is localized in small groups of cells, called meristems, which are already present in the embryo and are active during most of the cell cycle of the plant. The cell cycle that occurs in dividing cells consists of the alternating phases of DNA replication (S phase) and chromosome separation (mitosis, or M phase) interrupted by gaps known as G1 (interval between M and S phases) and G2 (interval between S and M phases). Important controls operate at the transition points as cells move from G1 into S phase, and from G2 into M phase (Beemster et al. 2003). Both the G1-S and G2-M phase transitions can be controlled in plant cells in response to phytohormones such as auxins and cytokinins. An example of G2 control is found in the development of lateral root primordia, which are derived from pericycle cells arrested in G2. These cells move into M phase upon auxin stimulation and then continue to proliferate, producing a lateral root primordium that eventually emerges from the side of the primary root (Himanen et al. 2002).

Ramírez-Chávez and coworkers (2003) evaluated the effects of affinin on cell division by using the G2-M specific marker *CycB1:uidA*, which is expressed only in dividing cells. In response to micromolar concentrations of affinin, a dose-response reduction in the number of cells expressing *CycB1:uidA* was observed in root meristems. Meristem cells of *Arabidopsis* roots grown in the presence of NAE 12:0 also displayed abnormal cell division patterns characterized by oblique wall formation and the appearance of numerous irregularly shaped cells that varied in size (Blancaflor et al. 2003). Interestingly, the opposite effect was observed in leaves exposed to *N*-isobutyl decanamide, in which the formation of blades on petioles and callus-like structures could be observed (López-Bucio et al. 2007). These results suggest that localized effects of alkamides are important for cell proliferating activity of these compounds.

## **(6.2). Microtubule stability**

Cellular elongation in roots has been shown to be dependent on the cortical microtubule cytoskeleton. Drugs that either depolymerize or stabilize microtubules in roots cause a significant reduction in root growth rate that eventually leads to radial expansion (Baskin et al. 1994). In primary roots, cortical microtubules in cells of the elongation zone are typically arranged transverse to the longitudinal axis of the root. This orientation shifts to oblique or longitudinal arrays as the cells make their transition into the maturation zone. Continuous exposure to 50  $\mu$ M NAE 12:0 (Blancaflor et al. 2003), or 36  $\mu$ M *N*-isobutyl decanamide (Méndez-Bravo et al. unpublished) caused radial swelling in roots of *Arabidopsis* seedlings (Fig. 3a and b). Instead of the typical cylindrical cell shape observed in the differentiation zone of untreated roots, cells of alkamide-treated roots were shorter and wider. Microtubules in cells with altered shape were oriented in random directions and appeared to be fragmented and disorganized (Fig. 3c and d). This change in microtubule orientation and size, and cell elongation creates a link between acylamides and root architecture.

## **(7). AHLs: inter-kingdom signals for plant-bacterial interactions**

Bacterial cells communicate with each other using chemical signals. Specifically, they release, detect, and respond to the accumulation of compounds, which allow bacteria to coordinate their gene expression in responses to changes in the population density, a process commonly referred to as quorum-sensing (Waters and Bassler 2005). Many processes in bacteria are regulated by quorum-sensing, including symbiosis, virulence, antibiotic production and biofilm formation. Gram-negative bacteria use *N*-acyl-homoserine lactones (AHLs) to communicate and regulate their quorum-sensing, these compounds contain a conserved homoserine lactone (HL) ring and an amide (*N*)-linked acyl side chain (Table 1). The acyl groups of naturally occurring AHLs range from 4 to 18 carbons in length; they can be saturated or insaturated and with or without a C-3 substituent (Reading and Sperandio 2006). Recent evidence shows, however, that quorum-sensing signaling is not restricted to bacterial cell-to-cell communication, but also allows communication between plants and their prokaryote partners (Hughes and Sperandio 2008). The presence of AHL-producing bacteria in the rhizosphere of tomato induced the salicylic acid and ethylene-dependent defense response, which plays an

important role in activation of systemic resistance in plants and conferred resistance to the fungal pathogen *Alternaria alternata* (Schuhegger et al. 2006). In addition, certain *Rhizobium* mutants that fail to produce or sense AHLs were unable to nodulate legume plants, suggesting that AHLs may play a role in nodulation (Zheng et al. 2006). Our research aimed to clarify the role of AHLs in plant development revealed that these compounds exert strong and specific cellular responses similar to NAEs and alkamides, including arrested cell proliferation in the primary root meristem and enhanced lateral root formation (Ortíz-Castro and López-Bucio, unpublished).

#### **(8). Concluding remarks**

Most plant hormones are pleiotropic rather than specific, that is, each has more than one effect on the growth and development of plants. Auxin, for instance, stimulate the rate of cell elongation at low concentrations with inhibitory effects at high concentrations, it causes shoots to grow up and roots to grow down and promotes the formation and growth of lateral roots and shoot branches. Auxin also causes the plant to produce a second hormone, ethylene, to elicit a plethora of additional responses. Ethylene, in turn, regulates auxin biosynthesis and alters auxin-responsive gene expression (Stephanova et al. 2007). The other well-known plant hormones gibberellins, abscisic acid and cytokinins have a similarly complex array of functions. We think such interactions may also exist for NAEs and alkamides. These compounds are part of a vast array of amino compound-containing lipids highly ubiquitous to organisms from bacteria to mammals. Lipids are integral components of the cell membrane, the prime and essential limit of cells with its environment. Small signaling NAEs can be released from the membrane by PLD enzymes in response to biotic or abiotic stimuli (Bargmann and Munnik 2006). The presented information suggests that acylamides can be perceived by plants. NAEs and alkamides may actually function by activating other signaling pathways already important for plant development such as cytokinins and abscisic acid, or by inducing accumulation of NO, a highly active messenger for cellular responses. This information suggests that these lipids are not merely structural components, but also important players involved in the orchestrated adjustment of anatomical characteristics. Such adjustment may account to the morphological adaptations to limit exposure to unfavorable environmental conditions.

NAEs and alkamides are believed to act, at least in part, by an endocannabinoid-like signaling mechanisms similar to that described in animals (López-Bucio et al. 2006; Morquecho-Contreras and López-Bucio 2007). Our recent findings add further complexity for plant responses to these lipids. In a search for alkamide-related compounds from bacteria that could modify root growth, we identified the *N*-acyl homoserine lactones, a class of bacterial quorum-sensing signals as important regulators of plant morphogenesis (Ortíz-Castro and López-Bucio, unpublished). Thus the possibility is open that amino compound-containing lipids could represent a novel class of signals for plant-bacterial communication. Elucidating how alkamides interact with classic and novel signals to regulate plant development remains a major challenge. The adoption of an integrated approach that combines genetics, molecular biology, cell biology and analytical chemistry should increase our knowledge on the signaling pathways involved in small lipid perception in plants.

## (9). References

- Anaya AL, Macías-Rubalcava M, Cruz-Ortega R, García-Santana C, Sánchez-Monterrubio PN, Hernández-Bautista BE, Mata R (2005) Allelochemicals from *Stauranthus perforatus*, a rutaceous tree of the Yucatán Peninsula, México. *Phytochemistry* 66:487-494
- Bauer R, Reminger P (1989) TLC and HPLC analysis of alkaloids in *Echinacea* drugs. *Planta Med* 55:367-371
- Bargmann BO, Munnik T (2006) The role of phospholipase D in plant stress responses. *Curr Opin Plant Biol* 9:515-522
- Baskin TI, Wilson JE, Cork A, Williamson RE (1994) Morphology and microtubule organization in *Arabidopsis* roots exposed to orizalyn or taxol. *Plant Cell Physiol* 35:935-942
- Beemster GTS, Fiorani F, Inzé D (2003) Cell cycle: the key to plant growth control?. *Trends Plant Sci* 8:154-158
- Blancaflor EB, Hou G, Chapman KD (2003) Elevated levels of *N*-lauroylethanolamine, an endogenous constituent of desiccated seeds, disrupt normal root development in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Planta* 217:206-217
- Campos-Cuevas JC, Pelagio-Flores R, Raya-González J, Méndez-Bravo A, Ortiz-Castro R, López-Bucio J (2008) Tissue culture of *Arabidopsis thaliana* explants reveals a stimulatory effect of alkaloids on adventitious root formation and nitric oxide accumulation. *Plant Sci* 174:165-173
- Caramelo JJ, Florin-Christensen J, Delfino JM (2003) Phospholipase activity on *N*-acyl phosphatidylethanolamines is critically dependent on the *N*-acyl chain length. *Biochem J* 374:109-115
- Casimiro I, Beekman T, Graham N, Bhalerao R, Zhang H, Casero P, Sandberg G, Bennett M (2003) Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends Plant Sci* 8:165-171
- Chapman KD (2004) Occurrence, metabolism, and prospective functions of *N*-acyl ethanolamines in plants. *Prog Lipid Res* 43:309-327
- Christensen L, Lam J (1991) Acetylenes and related compounds in Heliantheae. *Phytochemistry* 30:11-49
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G (2006) Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol* 171:501-523

Ha CM, Kin GT, Kim BC, Jun JH, Soh MS, Ueno Y, Machida D, Tsukaya H, Nam HG (2003) The blade on petiole 1 gene controls leaf pattern formation through the modulation of meristematic activity in *Arabidopsis*. *Development* 130:161-172

Hansen H, Moesgaard B, Petersen G, Hansen H (2002) Putative neuroprotective actions of *N*-acyl-ethanolamines. *Pharmacol Ther* 95:119-127

Herms DA, Mattson WJ (1992) The dilemma of plants: to grow or defend. *Quarterly Rev Biol* 67:283-319

Himanen K, Boucheron E, Vaneste S, Almeida-Engler J, Inzé D, Beeckamn T (2002) Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell* 14:2339-2351

Howell SH, Lall S, Che P (2003) Cytokinins and shoot development. *Trends Plant Sci* 9:453-459

Hughes DT, Sperandio V (2008) Inter-kingdom signaling: communication between bacteria and their hosts. *Nat Rev Microbiol* 6:111-120

Kakimoto T (2003) Perception and signal transduction of cytokinins. *Annu Rev Plant Biol* 54:605-627

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

Kashiwada Y, Ito C, Katagiri H, Mase I, Komatsu K, Namba T, Ikeshiro Y (1997) Amides of the fruit of *Zanthoxylum* spp. *Phytochemistry* 44:1125-1127

Kunos G, Jarai Z, Batkai S, Isaac EJ, Liu J, Wagner JA (2000) Endocannabinoids as vascular modulators. *Chem Phys Lipids* 108:159-168

Lafrance D, Marion D, Pezolet M (1990) Study of the structure of *N*-acyl dihexadecanoyl phosphatidylethanolamines in aqueous dispersion by infrared and Raman spectroscopies. *Biochemistry* 29:4592-4599

Lamattina L, García-Mata C, Graciano M, Pagnussat G (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu Rev Plant Biol* 54:109-136

Laurerio-Rosario S, Silva A, Parente J (1996) Alkamides from *Cissampelos glaberrima*. *Planta Med* 62:376-377

Laux T, Mayer KFX (1998) Cell fate regulation in the shoot meristem. *Sem Cell Dev Biol* 9:195-200

Letchamo W, Livesey J, Arnason TJ, Bergeron C, Krutilina VS (1999) Cichoric acid and isobutylamide content in *Echinacea purpurea* as influenced by flower

developmental stages. In: Janick J (Ed) Perspectives on new crops and new uses, ASHS Press, Alexandria, VA, pp 494-498

Liu J, Wang L, Harvey-White J, Osei-Hyiaman D, Razdan R, Gong Q, Chan AC, Zhou Z, Huang BX, Kim HY, Kunos G (2006) A biosynthetic pathway for anandamide. Proc Natl Acad Sci USA 103:13345-13350

López-Bucio J, Acevedo-Hernández G, Ramírez-Chávez E, Molina-Torres E, Herrera-Estrella L (2006) Novel signals for plant development. Curr Opin Plant Biol 6:280-287

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

LoVerme J, Russo R, La Rana G, Fu J, Farthing J, Raso G, Meli R, Hohmann A, Calignano A, Piomelli D (2006) Rapid broad-spectrum analgesia through activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. J Pharmacol Exp Ther 319:1051-1061

Malamy J, Benfey P (1997) Down and out in *Arabidopsis*: the formation of lateral roots. Trends Plant Sci 2:390-401

Molina-Torres J, Salgado-Garciglia R, Ramírez-Chávez E, del Río R (1996) Purely oleofinic alkamides in *Heliopsis longipes* and *Acmella (Spillanthes) oppositifolia*. Biochem System Ecol 24:43-47

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

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

Movahed P, Jonsson BA, Birnir B, Wingstrand JA, Jorgensen TD, Ermund A, Sterner O, Zygmunt PM, Hogestatt ED (2005) Endogenous unsaturated C18 *N*-acylethanolamines are vanilloid receptor (TRPV1) agonists. J Biol Chem 280:38496-38504

Neill SJ, Desikan R, Hancock JT (2003) Nitric oxide signaling in plants. New Phytol 159:11-35

Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N (2004) Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. J Biol Chem 279:5298-5305

- Oz M, Alptekin A, Tchugunova Y, Dinc M (2005) Effects of saturated long-chain *N*-acylethanolamines on voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> fluxes in rabbit T-tubule membranes. *Arch Biochem Biophys* 434:344-351
- Pappan K, Austin-Brown S, Chapman K, Wang X (1998) Substrate selectivities and lipid modulation of plant phospholipase D alpha, -beta, and gamma. *Arch Biochem Biophys* 353:131-140
- Paria BC, Dey SK (2000) Ligand-receptor signaling with endocannabinoids in preimplantation embryo development and implantation. *Chem Phys Lipids* 108:211-220
- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme KJ, Jansen MAK (2007) Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends Plant Sci* 12:98-105
- Qu L, Chen Y, Wang X, Scalzo R, Davis JM (2005) Patterns of variation in alkamides and cichoric acid in roots and above ground parts of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *HortSci* 40:1239-1242
- Ramírez-Chávez E, López-Bucio J, Herrera-Estrella L, Molina-Torres J (2004) Alkamides isolated from plants promote growth and alter root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 134:1058-1068
- Razem FA, Baron K, Hill RD (2006) Turning on gibberellin and abscisic acid signaling. *Curr Opin Plant Biol* 9:454-459
- Reading NC and Sperandio V (2006) Quorum-sensing: the many languages of bacteria *FEMS Microbiol letters* 254:1-11.
- Ríos-Chávez P, Ramírez-Chávez E, Armenta-Salinas C, Molina-Torres J (2003) *Acmella radicans* var. *radicans*: in vitro culture establishment and alkamide content. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 39:37-41
- Schuhegger R, Ihring A, Gantner S, Bahnweg G, Knappe C, Vogg G, Hutzler P, Schmid M, Van Breusegem F, Eber L, Hartmann A, Langebartels C (2006) Induction of systemic resistance in tomato by *N*-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant cell Environ* 29: 909-918.
- Shresta R, Dixon RA, Chapman KD (2003) Molecular identification of a functional homologue of the mammalian fatty acid amide hydrolase in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 278:34990-34997
- Shresta R, Kim SC, Dyer JM, Dixon RA, Chapman KD (2006) Plant fatty acid (ethanol) amide hydrolases. *Biochem Biophys Acta* 176:324-334

Simon GM, Cravatt BF (2006) Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-*N*-acylethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase in this pathway. *J Biol Chem* 281:26465-26472

Stephanova AN, Jeonga Y, Likhacheva AV, Alonso JM (2007) Multilevel interactions between ethylene and auxin in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 19:2169-2185

Swamy MJ, Ramakrishnan M, Angerstein B, Marsh D (2000) Spin-label electron spin resonance studies on the mode of anchoring and vertical location of the *N*-acyl chain in *N*-acyl phosphatidylethanolamines. *Biochemistry* 39:12476-12484

Teaster ND, Motes C, Tang Y, Wiant W, Cotter MQ, Wang YH, Kilaru A, Venables BJ, Hasenstein KH, González G, Blancaflor E, Chapman KD (2007) *N*-acylethanolamine metabolism interacts with abscisic acid signaling in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell* 19:2454-2469

Tripathy S, Venables B, Chapman K (1999) *N*-acylethanolamines in elicitor signal transduction and activation of defense gene expression. *Plant Physiol* 121:1299-1308

Tsuboi K, Sun YX, Okamoto Y, Araki N, Tonai T, Ueda N (2005) Molecular characterization of *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase, a novel member of the choloylglycine hydrolase family with structural and functional similarity to acid ceramidase. *J Biol Chem* 280:11082-11092

Venables BJ, Waggoner CA, Chapman KD (2005) *N*-acylethanolamines in selected legumes. *Phytochemistry* 66:1913-1918

Wang X (2004) Lipid signaling. *Curr Opin Plant Biol* 7:329-336

Wang YS, Shresta R, Kilaru A, Wiant W, Venables BJ, Chapman KD, Blancaflor E (2006) Manipulation of *Arabidopsis* fatty acid amide hydrolase expression modifies plant growth and sensitivity to *N*-acylethanolamines. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:12197-12202

Waters CM, Bassler BL (2005) Quorum-sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 319-346.

Weyers JDB, Paterson NW (2001) Plant hormones and the control of physiological processes. *New Phytol* 152:375-407

Wilson RI, Nicoll RA (2002) Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 296:678-682

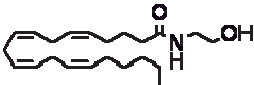

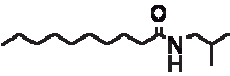
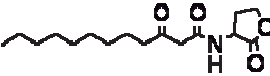
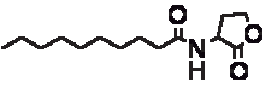
Woodward AW, Bartel B (2005) auxin: regulation, action and interaction. *Annals Bot* 95:707-735

Worrall D, Ng CKY, Hetherington AM (2003) Sphingolipids, new players in plant signaling. Trends Plant Sci 8:317-320

Wymann MP, Schneider R (2008) Lipid signaling in disease. Nat Rev Mol Cell Biol 9:163-176

Zheng H, Zhong Z, Lai X, Chen WX, Li S and Zhu J (2006) A *luxR/luxI*-type quorum sensing system in a plant bacterium *Mesorhizobium tianshanense*, controls symbiotic nodulation. J Bacteriol 188:1943-1949.

Table 1. Characteristics of NAEs, alkamides and AHLs

Producing organism	Compound	Function
Animals	 <i>N</i> -arachidonoyl ethanolamide (Anandamide)	Modulation of neurotransmission in central nervous system Synchronization of embryo development Brain development Cell proliferation Cardiovascular and immune regulation
<i>Arabidopsis thaliana</i>	 <i>N</i> -acyl ethanolamine (NAE 12:0)	Regulation of seed germination Regulation of cell division and expansion Regulation of root architecture Control of cytoskeletal structure
<i>Acmella radicans</i>	 <i>N</i> -isobutyl decanamide	Regulation of cell division Regulation of root architecture Activation of cytokinin-signaling
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	 <i>N</i> -3-oxo-dodecanoyl-HL	Virulence and biofilm formation
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	 <i>N</i> -decanoyl-HL	Population growth

## Figure legends

Figure 1. Effects of *N*-isobutyl decanamide on *Arabidopsis* shoot and root development. (a-c) Shoot development of 21-day-old *Arabidopsis thaliana* grown on (a) 0, (b) 28 and (c) 56  $\mu\text{M}$  *N*-isobutyl decanamide. Note the formation of blades on petioles and callus-like structures on leaf surfaces (arrows). (d-f) Close up of developing blades on petioles showing the presence of trichomes (arrows). (g-i) Close up of callus-like structures formed over the surface of leaves. (j-l) Adventitious root development of *Arabidopsis* seedlings, which were grown for 18 d on (j) 0, or (k and l) 56  $\mu\text{M}$  *N*-isobutyl decanamide. Note the proliferation of adventitious roots on the stem region of *N*-isobutyl decanamide treated plants. (m-p) Development of the root apical zone of 12-day-old *Arabidopsis* seedlings, which were grown on (m) 0, (n) 14, (o) 28 and (p) 56  $\mu\text{M}$  *N*-isobutyl decanamide. The shorter distance between the root tip and the root hair zone is an indication of a faster differentiation process [compare (m) and (n)] and the increase in root hair density. Note the formation of lateral roots close to the root tip (o) and the conversion of the primary root tip and lateral roots into callus-like structures (p). Scale bars = 500  $\mu\text{m}$ .

Figure 2. Effects of *N*-isobutyl decanamide on cell elongation and microtubule stability. (a and b) Confocal microscope images of (a) 0 and (b) 56  $\mu\text{M}$  *N*-isobutyl decanamide-treated root epidermal cells. Note the shorter size of alkamide-treated cells. (c and d) Organization of epidermal microtubules in root cells of 12-day-old *Arabidopsis* seedlings. (c) Microtubules in the epidermal cells of control roots and (d) roots treated with 56  $\mu\text{M}$  *N*-isobutyl decanamide. Note the fragmented and randomly oriented microtubules in alkamide-treated cells.

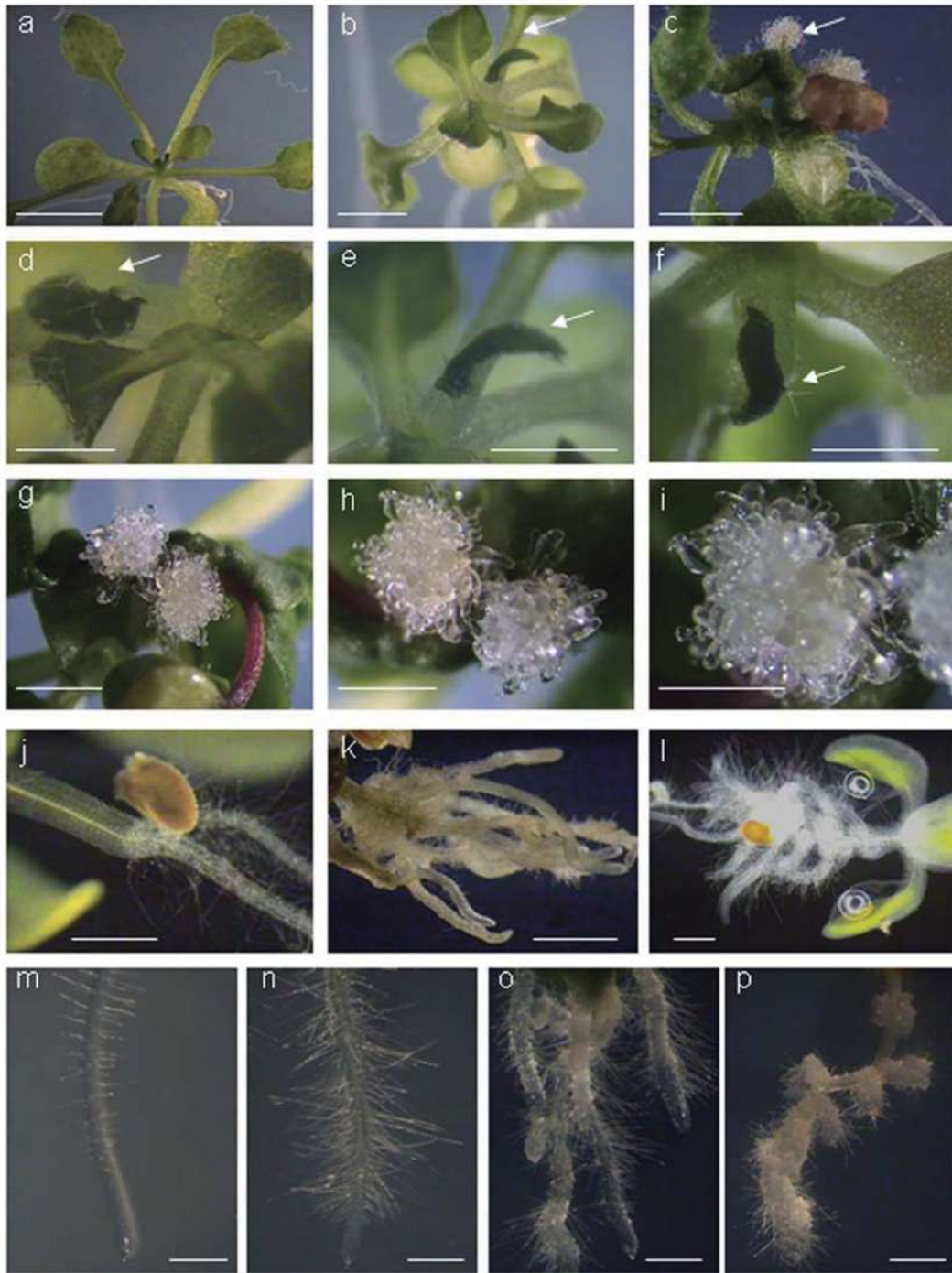


Figure 1

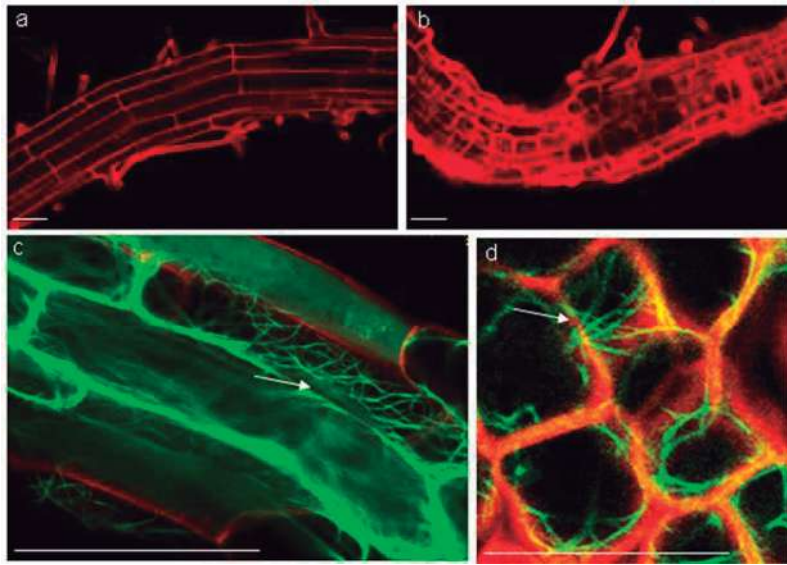


Figure 2