



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Análisis del efecto de poliaminas en líneas
reporteras de *Arabidopsis*: ciclo celular y
respuesta tipo auxina**

Tesis que presenta

María Azucena Ortega Amaro

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

San Luis Potosí, S.L.P., 12 enero de 2008



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “Análisis del efecto de poliaminas en líneas reporteras de Arabidopsis: ciclo celular y respuesta tipo auxina” presentada para obtener el Grado de de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **QFB Maria Azucena Ortega Amaro** y aprobada el **12 de enero de 2009** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

(Director de la tesis)

Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler

(Asesor de la tesis)

Dr. Ángel G. Alpuche Solís

(Asesor de la tesis)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos y Plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 058 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 12 días del mes de enero del año 2009, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler	Presidente	UNAM
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Secretario	IPICYT
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

María Azucena Ortega Amaro

sobre la Tesis intitulada:

Análisis del efecto de Poliaminas en líneas reporteras de Arabidopsis thaliana: Ciclo Celular y Respuesta tipo Auxina

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 12:45 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., a los 12 días del mes de enero de 2009.

Dr. Marcial Bonilla
Secretario Académico



Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont por su apoyo incondicional y confianza.

A la Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler y al Dr. Ángel Alpuche Solís, por sus ideas, sugerencias y el tiempo empleado en la revisión de esta tesis.

A mis compañeros del Laboratorio: Alicia, Claudia, Eloísa, Erika, Lorena, Luz, Pablo y Telma por su amistad, apoyo y los buenos momentos.

A Ismael y Luzmila por su apoyo incondicional.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica y al Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	6
2.2 Medición de raíz y de peso fresco de plántulas de <i>A. thaliana</i> (línea CYCB1;1::uidA) en el tratamiento de adición de poliaminas y de inhibidores de la biosíntesis de poliaminas.....	6
2.3 Tratamiento de la aplicación exógena de NaCl y PAs en la línea CYCB1;1::uidA.....	7
2.4 Análisis histoquímico de GUS.....	8
2.5 Cruzas de líneas marcadoras de ciclo celular y de respuesta tipo auxina con líneas deficientes en la síntesis de putrescina.....	8
2.6 Análisis estadísticos de los datos.....	10
III. RESULTADOS	
3.1 Efecto de la aplicación de poliaminas exógenas y de inhibidores de la biosíntesis de poliaminas sobre el desarrollo de Arabidopsis.....	11
3.2 Efecto de la aplicación exógena de poliaminas y de sus inhibidores en el ciclo celular de Arabidopsis.....	14
3.3 Efecto del estrés salino en el ciclo celular de Arabidopsis.....	17



3.4 Efecto de la adición de poliaminas exógenas en la respuesta tipo auxina.....	20
3.5 Efecto de la inhibición de la biosíntesis de poliaminas en la respuesta tipo auxina de Arabidopsis.....	21
3.6 Obtención de líneas reporteras de ciclo celular y de respuesta de expresión de genes inducidos por auxinas con mutantes en <i>adc1^{-/-}/adc2^{-/-}</i>	23
IV. DISCUSIÓN.....	24
V. REFERENCIAS.....	31

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cruzas de líneas marcadoras de ciclo celular y de respuesta tipo auxina con líneas mutantes <i>adc1^{-/-}/adc2^{-/-}</i>	10
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efecto de inhibidores de la biosíntesis de poliaminas y de la aplicación exógena de poliaminas sobre el crecimiento de la línea marcadora <i>CYCB1;1::uidA</i> de <i>A. thaliana</i>	12
Figura 2. Medición de raíz y determinación del peso fresco en la línea marcadora <i>CYCB1;1::uidA</i> de <i>A. thaliana</i>	13
Figura 3. Efecto de la adición de poliaminas sobre la división celular.....	15
Figura 4. Efecto de la adición exógena de Spd en la línea <i>CYCB1;1::uidA</i> de <i>Arabidopsis</i>	15
Figura 5. Efecto de los inhibidores de la biosíntesis de poliaminas en la división celular.....	16
Figura 6. Efecto del estrés salino en la división celular.....	17
Figura 7. Efecto de las PAs durante el estrés salino en la división celular.....	19
Figura 8. Efecto de la adición poliaminas en la línea reportera <i>DR5::uidA</i> de <i>A. thaliana</i>	21
Figura 9. Efecto de los inhibidores de la biosíntesis de poliaminas en la línea mutante <i>DR5::uidA</i> de <i>A. thaliana</i>	22

RESUMEN

Las poliaminas (PAs) se han considerado como nuevos reguladores de crecimiento en plantas, involucrados en diversos procesos fisiológicos como la proliferación celular y diferenciación, así como en la respuesta al estrés. En el genoma de *Arabidopsis thaliana*, ya han sido identificados y localizados todos los genes involucrados en la biosíntesis de PAs. Se ha descrito que durante el ciclo celular existen aumentos en los niveles de PAs, en las transiciones G1/S y G2/M, por lo que son considerados compuestos clave en la progresión del ciclo. Utilizando la línea reportera del ciclo celular (*CYCB1;1::uidA*) analizamos el efecto de la aplicación exógena de PAs, inhibidores de su biosíntesis y de estrés salino en el crecimiento y división celular de *Arabidopsis*. Al añadir las PAs superiores, espermidina y espermina (Spd y Spm), se observa una expresión tejido y concentración específica, obteniendo un aumento drástico en la expresión del gen reportero en meristemas de raíz, tallo y hojas, encontrando una clara estimulación del ciclo celular por PAs. Asimismo, probamos la adición de PAs y sus inhibidores en la línea reportera *DR5::uidA* de *Arabidopsis*, la cual monitorea la respuesta génica inducida por auxinas. Nuestros resultados muestran que las PAs aumentan la expresión de GUS, y por el contrario, MGBG (Metil Glioxal Bis Guanidina), un inhibidor de la enzima SAMDC, reprime la expresión del gen reportero. Esto sugiere la participación de las PAs en la respuesta génica inducida por auxinas. En conclusión, este trabajo evidencia la importancia de las PAs en el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana*.

Palabras clave: *Arabidopsis*, auxinas, ciclo celular, estrés salino, poliaminas.

ABSTRACT

The polyamines (PAs) have been identified as new plant growth regulators, involved in various physiological processes such as cell proliferation and differentiation, as well as the stress response. In the genome of *Arabidopsis thaliana*, have already been identified and located on all the genes involved in biosynthesis of PAs. It has been reported that during the cell cycle, there are increases in the levels of PAs in the transition G1/S and G2/M and they are considered key compounds in the progression of the cycle. Using the reporter cell cycle (*CYCB1;1::uidA*) we analyzed the effect of exogenous application of PAs, their biosynthesis inhibitors and salt stress on growth and cell division in *Arabidopsis*. By adding the higher PAs, spermidine and spermine, a tissue expression and concentration, gives a dramatic increase in reporter gene expression in the root meristem, stem and leaves, causing a clear stimulation of cell cycle by PAs. Furthermore, we tested the addition of PAs and their inhibitors in the line reporter *DR5::uidA* in *Arabidopsis*, which monitors the response gene induced by auxin. Our results show that PAs increase of GUS expression, and conversely, Methyl Glyoxal Bis guanidine, an inhibitor of S-Adenosil methionine decarboxylase enzyme, represses the expression of the reporter gene. This suggests the involvement of PAs in response gene induced by auxin. In conclusion, this work demonstrates the importance of PAs in growth and development of *A. thaliana*.

Keywords: *Arabidopsis*, auxin, cell cycle, salt stress, polyamines.

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, las poliaminas (PAs) se han considerado como nuevos reguladores de crecimiento en plantas involucrados en diversos procesos fisiológicos como la proliferación celular y diferenciación, la senescencia así como en la respuesta al estrés (Bouchereau *et al.*, 1999; Kakkar *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 1997; Malmberg *et al.*, 1998; Walden *et al.*, 1997). La putrescina (Put), la espermidina (Spd) y la espermina (Spm) son las poliaminas de mayor distribución en la naturaleza. En las plantas, la Put se forma mediante la descarboxilación de la arginina o de la ornitina, reacción catalizada por la arginina descarboxilasa (ADC) o por la ornitina descarboxilasa (ODC), respectivamente. La adición sucesiva de 2 grupos aminopropilos a la Put, en dos reacciones catalizadas por la espermidina sintasa (SPDS) y la espermina sintasa (SPMS), llevan a la formación de Spd y Spm, respectivamente. Los grupos aminopropilos provienen de la descarboxilación de S-adenosilmetionina (SAM) por la S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC) (Tiburcio *et al.*, 1997). Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo por el cual estos compuestos actúan en el desarrollo y la respuesta al estrés, haciendo de gran utilidad el estudio genético y molecular de la ruta biosintética de las PAs *in planta*.

En el genoma de *Arabidopsis thaliana*, la planta modelo en biología molecular, ya han sido identificados y localizados todos los genes involucrados en la biosíntesis de PAs (Illingworth *et al.*, 2003; Janowitz *et al.*, 2003; Piotrowski *et al.*, 2003;) excepto el gen que codifica para la ODC (Hanfrey *et al.*, 2001; Jiménez-

Bremont *et al.*, 2004). Aunque algunos reportes sugerían la presencia de actividad ODC en *A. thaliana* (Feirer *et al.*, 1997), se ha confirmado que Arabidopsis no cuenta con dicha actividad (Hanfrey *et al.*, 2001) indicando que las PAs son producidas únicamente por la vía de la ADC. Utilizando mutantes insercionales de *A. thaliana* en los dos parálogos del gen *ADC* (*AtADC1* y *AtADC2*), Urano *et al.*, en el 2005 demostraron que esta vía es esencial para el desarrollo embrionario al no obtener semillas viables de la cruce doble de las mutantes *adc1^{-/-} adc2^{-/-}*. En el caso de las mutantes heterocigotas para uno de los genes de la *ADC* y homocigotas para el otro (*adc1^{+/-} adc2^{-/-}* y *adc1^{-/-} adc2^{+/-}*) las semillas presentaron anomalías en las silicuas en condiciones normales, pero continuaron con su desarrollo normal.

Urano *et al.* (2003), analizaron la mutante simple del gen *AtADC2* en Arabidopsis bajo estrés salino, encontrando que la mutante *adc2^{-/-}* presenta una disminución del 25% del contenido de Put respecto al control, presentando una alta sensibilidad a dicho estrés. Cuando la mutante *adc2^{-/-}* se creció en condiciones normales no hubo alteraciones en el fenotipo, en los contenidos de Spd y Spm, ni en la expresión del gen *AtADC1*. En comparación, la *adc1^{-/-}* no mostró fenotipo bajo estrés salino.

Por otro lado, para la sobreexpresión del gen *AtADC2* en *A. thaliana*, las plantas acumulaban niveles elevados de Put, sin cambios significativos en el contenido de Spd y Spm, además de tener un fenotipo de plantas enanas con retraso en la floración y deficiencia en la producción de giberelinas (Alcázar *et al.*, 2005).

Estudios de los promotores de ambos genes de la ADC de *A. thaliana* (*AtADC1* y *AtADC2*) indican una expresión diferencial. Por un lado, la actividad del promotor de la ADC2 se induce durante la germinación y desarrollo de la semilla, en cambio, el promotor de la ADC1 responde a estrés por frío (Hummel *et al.*, 2004). Como lo descrito para la doble mutante ADC de *A. thaliana*, en el caso de la doble mutante de los genes *SPDS1* y *SPDS2* que codifican para espermidina sintasa, también se encontró que son esenciales para la viabilidad de *Arabidopsis* al determinar que las mutantes, *SPDS1-1* y *SPDS2-2*, detienen su desarrollo en la fase embrionaria (Imai *et al.*, 2004a). Por el contrario, el fenotipo no fue letal para la doble mutante *SPMS^{-/-}ACL5^{-/-}* deficiente en espermina, lo cual sugiere que la poliamina vital es la espermidina y su precursor, la putrescina. En el caso del gen *AtSPMS*, que codifica para una espermina sintasa, no observaron un fenotipo en la mutante de dicho gen. Sin embargo, el gen *ACL5* que codifica para una termo-espermina sintasa, muestra un fenotipo de reducción de la elongación del tallo. Este fenotipo también fue observado de igual forma para la doble mutante *SPMS^{-/-}ACL5^{-/-}* (Imai *et al.* 2004). Plantas de *Arabidopsis* que sobre expresan la *SPDS*, con niveles elevados de Spd, presentan una mayor tolerancia al estrés abiótico, al igual que las plantas que sobre expresan *SAMDC1* incluyendo estrés por frío, congelación, salinidad, hiper-osmótico y toxicidad por paraquat (Busó *et al.*, 2006; Kasukabe *et al.*, 2004).

Los reportes anteriores muestran que las PAs son vitales para las plantas, y sugieren una importante participación de las mismas en procesos de crecimiento, desarrollo y de respuesta al estrés.

Por la característica sésil de las plantas, el ciclo celular es un punto de control fundamental tanto en el crecimiento, desarrollo y respuesta a estrés, ya que las plantas no pueden escapar de situaciones adversas y deben ajustar su crecimiento y desarrollo a los cambios permanentes del medio ambiente, lo que les ha permitido colonizar exitosamente hábitats extremos. Analizando el genoma de *Arabidopsis*, es evidente que la regulación del ciclo celular en plantas es mucho más compleja que en animales, dado que las cinasas dependientes de ciclina (CDKs), ciclinas e inhibidores de ciclinas (KRPs) exceden al número de genes encontrados en animales (Vandepoele *et al.*, 2002). Se ha descrito que durante el ciclo celular existen aumentos en los niveles de PAs, en las transiciones G1/S y G2/M, por lo que son considerados compuestos claves. Por ejemplo, un estudio realizado en protoplastos de avena demostró que las PAs estimulan la síntesis de ADN y el inicio de la actividad mitótica (Galston *et al.*, 1978; Kaur-Sawhney *et al.*, 1980). Asimismo, se ha destacado la capacidad de las PAs al interactuar con ácidos nucleicos protegiendo de daño al ADN por neutralización de carga y/o cambios en la conformación de la estructura de la cadena de ADN (Basu y Marton, 1995).

La generación de líneas reporteras de la división celular en *Arabidopsis* fue reportada por Colon-Carmona *et al.*, (1999), en la que al fusionar el promotor del gen Ciclina B1 (*CYCB1;1*), el gen reportero GUS (*uidA*) y la caja de destrucción ubicada en el n-terminal de la Ciclina B1, se permite monitorear sitios donde se llevan a cabo eventos de división celular en la planta, siendo una herramienta útil para estudiar el efecto de factores ambientales, hormonas y metabolitos sobre la división celular.

Por otro lado, la línea *DR5::uidA* de *Arabidopsis* responde de manera específica a compuestos tipo auxina al contener en la región promotora un elemento sintético de respuesta a auxinas altamente activo (DR5), el cual fue creado por mutaciones sitio dirigido del elemento natural AuxRE (TGTCTC) encontrado en el promotor GH3 de soya. El elemento DR5 consiste en bloques repetidos de 11pb (CCTCGTGTCTC) (Ulmasov *et al.*, 1997). La línea *DR5::uidA* proporciona un sistema reportero efectivo para estudiar la respuesta génica a auxinas en plantas.

En este estudio, se analizó el efecto de la aplicación exógena de PAs, inhibidores de la biosíntesis de PAs y estrés salino en el crecimiento y desarrollo de semillas de *Arabidopsis* basado en el patrón de expresión (GUS) de las líneas *CYCB1;1::uidA* (monitoreo del ciclo celular) y *DR5::uidA* (monitoreo de la respuesta a auxinas), dando una clara evidencia de la importancia de las PAs en el desarrollo de *A. thaliana*.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se emplearon las líneas de *A. thaliana* *CYCB1;1::uidA* (Colon-Carmona *et al.*, 1999), *DR5::uidA* y el ecotipo silvestre Col-0 (Ulmasov *et al.*, 1997). Las semillas de cada línea fueron esterilizadas con etanol al 95% (v/v) por 5 min y con una solución de cloro al 20% (v/v) por 7 min. Después de 5 lavados con agua destilada, las semillas fueron germinadas en placas de medio Murashige y Skoog (MS) al 0.2X, pH 5.7, conteniendo sacarosa al 0.5% (w/v), y agar al 1% (w/v). Las placas fueron incubadas en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 h/8 h (luz/oscuridad) a una temperatura de 22 °C ± 2 °C por dos y siete días dependiendo del tratamiento efectuado.

2.2 Medición de raíz y de peso fresco de plántulas de *A. thaliana* (línea *CYCB1;1::uidA*) en el tratamiento de adición de poliaminas y de inhibidores de la biosíntesis de poliaminas

Se prepararon stocks 1M de cada PA (Put, Spd y Spm) y se esterilizaron por filtración. Las concentraciones utilizadas para los tratamientos con PAs fueron de 10 µM. Plántulas de 7 días de edad fueron colocadas en cajas Petri con medio MS adicionado con PAs e incubadas con un ángulo de 65° para favorecer un mejor crecimiento de la raíz en la superficie del medio. Como controles se emplearon plantas crecidas en medio MS sin PAs. Al cabo de 2 y 7 días de tratamiento las plántulas fueron removidas para obtener las mediciones del

tamaño (cm) de la raíz principal y del peso fresco (mg). Posteriormente, se realizaron ensayos histoquímicos para la determinación de la actividad GUS, como se describe más adelante.

Por otro lado, para los tratamientos con los inhibidores de la biosíntesis de poliaminas, MGBG (Metilglioxal-Bis-Guanilhidrazona) y D-ARG (D-arginina), se utilizaron concentraciones de 2, 4 y 8 mM. Plántulas de 7 días de edad fueron colocadas en cajas Petri con medio MS adicionado con inhibidores; incubadas con un ángulo de 65°. Como controles se emplearon plantas crecidas en medio MS sin inhibidores. Transcurridos 2 días de tratamiento se evaluaron los parámetros de tamaño de raíz principal y peso fresco, así como los ensayos histoquímicos de GUS (Jefferson, 1987).

2.3 Tratamiento de la aplicación exógena de NaCl y PAs en la línea *CYCB1;1::uidA*.

Para someter las plántulas de 7 días de edad a estrés salino durante dos días, se utilizaron concentraciones de 25, 50 y 75 mM de NaCl. Se utilizaron también mezclas de cada PA (10 μ M; Put, Spd y Spm) con las diferentes concentraciones NaCl previamente descritas. Como controles se emplearon plantas crecidas en medio MS con y sin PAs. Como lo descrito en los tratamientos previos, se evaluaron los parámetros de tamaño de raíz principal y peso fresco, así como los ensayos histoquímicos de GUS.

2.4 Análisis histoquímico de GUS

Para el análisis histoquímico de la actividad de GUS (Jefferson, 1987), las plántulas de *Arabidopsis* después del tratamiento correspondiente (p.e. PAs, inhibidores, etc.) fueron incubadas a 37 °C toda la noche con el buffer de reacción para GUS (5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-glucuronidasa 0.5 mg/mL en fosfato de sodio 100 mM, pH 7). Posteriormente, fueron sometidas a un proceso de aclaración de tejido según lo descrito por Malamy y Benfey (1997). Para cada línea y cada tratamiento se utilizaron al menos 10 plántulas. Las imágenes fueron generadas empleando los microscopios MOTIC modelo BA-300, LEICA modelo CH-9435 y en un estereoscopio MOTIC modelo SM2-168, y procesadas mediante el software MOTIC versión 4.0.

2.5 Cruzas de líneas marcadoras de ciclo celular y de respuesta tipo auxina con líneas deficientes en *adc1*^{-/-}/*adc2*^{-/-}

Para generar plantas de *Arabidopsis* que tuvieran marcadores de ciclo celular o con respuesta tipo auxina en un fondo mutante (*adc1*^{-/-} o *adc2*^{-/-}), deficientes en la síntesis de Put (Urano *et al.*, 2003), se seleccionaron plantas en la etapa inicial de la floración. Se realizaron una serie de cruzas por polinización dirigida (Tabla 1), en la cual bajo estéreo microscopio se abrió el primordio floral y se eliminaron las seis anteras sin dañar el pistilo de una de las líneas mientras que de otra se tomó de una nueva flor abierta el polen y se inocularon con éste los primordios florales de la primera. Se marcaron las plántulas con los datos parentales de las cruzas y se esperó el crecimiento de las silicuas después de la polinización.

Para la identificación de las líneas de la generación F2, que tuvieran las características deseadas (marcadora de ciclo celular o de respuesta a auxinas en un fondo mutante *adc1^{-/-}/adc2^{-/-}*), se realizaron escrutinios por PCR y análisis histoquímico de GUS. La extracción de ADN genómico se realizó mediante el método de Liu *et al.* (1995). Los oligonucleótidos específicos empleados fueron T-DNA LB (T-DNA left border) 5'-CAT TTT ATA ATA ACG CTG CGG ACA TCT AC-3', ADC1 F 5'-CTT CCC TGA AAC TTT CCC GAG AAA AT-3', ADC1 Ra 5'-TGT TAA ACC ATG TCA ATG AGC TGT TAT A-3', ADC1 Rb 5'-TAA TCA ATC GTA CGG TGA AGA TC-3', ADC2 F 5'-AAA GAC ATT TCA CTC TAA CAA CTA GCA A-3', ADC2 Ra 5'-AAG TGC TAA GTA GCA AAT AAA TAA AGA A-3', ADC2 Rb 5'-ATC GTA CAA TGA CGA TTT TAC GAT A-3'. Los sitios de inserción del T-DNA, es decir los alelos mutantes, se tipificaron por medio de PCR con los pares de oligonucleótidos ADC1 Ra/T-DNA LB y ADC2 Ra/T-DNA LB, para el caso de ADC1 se amplificó un fragmento de 1127 pb y para ADC2 de 941 pb. La obtención del fragmento para la identificación del alelo WT se amplificó al utilizar los oligonucleótidos ADC1 F/ADC1 Rb y ADC2 F/ADC2 Rb esperando fragmentos de 3040 y 3107 pb, respectivamente.

Tabla 1. Cruzas de líneas marcadoras de ciclo celular y de respuesta tipo auxina con líneas mutantes $adc1^{-/-}/adc2^{-/-}$. Las líneas marcadoras $CYCB1;1::uidA$ y $DR5::uidA$ fueron cruzadas por polinización dirigida con cada una de las líneas mutantes en la enzima ADC, encargada de la biosíntesis de Put (Urano *et al.*, 2003).

LÍNEAS	$adc1^{-/-}$	$adc2^{-/-}$
$CYCB1;1::uidA$	$CYCB1;1::uidA \times adc1^{-/-}$	$CYCB1;1::uidA \times adc2^{-/-}$
$DR5::uidA$	$DR5::uidA \times adc1^{-/-}$	$DR5::uidA \times adc2^{-/-}$

2.6 Análisis estadísticos de los datos

En todos los tratamientos realizados, el número mínimo de plantas por tratamiento fue de 10 y un máximo de 30, se evaluaron parámetros como el largo de la raíz principal y el peso fresco de las plántulas, los cuales fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial, empleando el software estadístico SAS (SAS Inst., Cary, NC, USA.). Las diferencias entre los tratamientos fueron evaluadas mediante la prueba “t” de student ($p < 0,05$).

III. RESULTADOS

3.1 Efecto de la aplicación de poliaminas exógenas y de inhibidores de la biosíntesis de poliaminas sobre el desarrollo de *Arabidopsis*

Plántulas de 7 días de edad de la línea transgénica *CYCB1;1::uidA* de *A. thaliana*, germinadas en placas de medio Murashige y Skoog (MS) fueron trasplantadas en cajas Petri con medio MS conteniendo las poliaminas (PAs): putrescina (Put) 10 μ M, espermidina (Spd) 10 μ M, espermina (Spm) 10 μ M y con los inhibidores de la biosíntesis de PAs: D-arginina (D-ARG) 2mM y Metilglioxal Bis-Guanilhidrazona (MGBG) 2mM, específicos para la arginina descarboxilasa (ADC) y la S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC), respectivamente.

En 1991 Mirza y Bagni reportaron la estimulación del crecimiento de la raíz principal de *Arabidopsis* a bajas concentraciones de Put así como el efecto contrario, es decir, la inhibición del crecimiento al aplicar difluorometilornitina (DFMO) 2.07 mM, un inhibidor específico de la síntesis de Put.

Como se puede observar en la Figura 1, el crecimiento de las líneas marcadoras *CYCB1;1::uidA* de *A. thaliana* se detiene al tratarlas con una concentración de 2mM de cada uno de los inhibidores MGBG y D-ARG (Figura 1B y 1C) durante 2 días; observando un daño más severo con el inhibidor MGBG respecto a la pérdida de la turgencia y elongación de la raíz. En la Figura 2, se muestra el tamaño de la raíz principal (en cm) y el peso fresco (en mg) de las líneas tratadas. De manera notoria, el tratamiento con MGBG indujo la mayor reducción en el tamaño de raíz principal así como en el peso fresco.

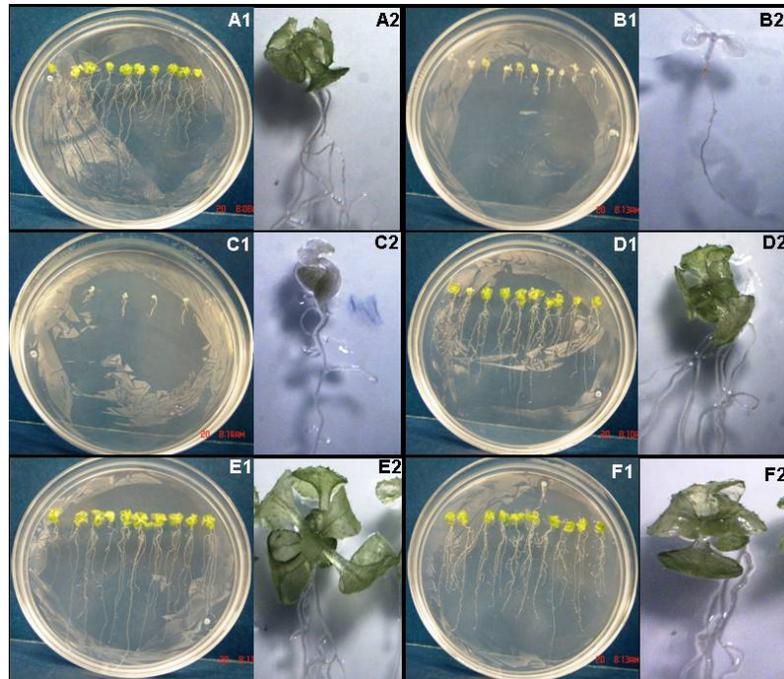


Figura 1. Efecto de inhibidores de la biosíntesis de poliaminas y de la aplicación exógena de poliaminas sobre el crecimiento de la línea marcadora *CYCB1;1::uidA* de *A. thaliana*. Para el tratamiento con los inhibidores (D-ARG y MGBG) se utilizó una concentración de 2mM por dos días; para el tratamiento con PAs (Put, Spd y Spm) se utilizó una concentración de 10 μ M por siete días. A1, A2 Control; B1, B2 MGBG; C1, C2 D-ARG; D1, D2 Put; E1, E2 Spd; F1, F2 Spm. Las imágenes fueron obtenidas bajo estereoscopio Motic.

El análisis de varianza realizado por ANOVA empleando la prueba “t” de student indica que no existe una diferencia significativa entre utilizar MGBG y L-ARG como inhibidores sobre el crecimiento de la raíz de *A. thaliana*. Sin embargo, este grupo si es estadísticamente diferente al resto de los tratamientos de aplicación exógena de PAs.

El efecto observado en las plántulas tratadas con PAs durante 7 días (Figura 1 D, E y F) fue un aumento en el crecimiento de la raíz principal en comparación con las plántulas control, y también registraron el mayor peso fresco, como se muestra en la Figura 2.

De los tratamientos aplicados, los de Spd y Spm lograron el mayor efecto de elongación de la raíz principal (3.70 y 3.42 cm en promedio) en comparación al control (2.81 cm en promedio) (Figura 2). Asimismo, con Spd y Spm se alcanzaron los pesos frescos más altos (10.7391 y 9.4870 mg en promedio) en comparación al control (7.8261 mg en promedio) (Figura 2). Nuestros datos apoyan estudios realizados por diversos grupos, donde se postula que la biosíntesis de PAs constituye una ruta esencial para el desarrollo de la planta (crecimiento de la raíz); donde efectos antagónicos pueden ser caracterizados mediante el uso de inhibidores específicos de su biosíntesis.

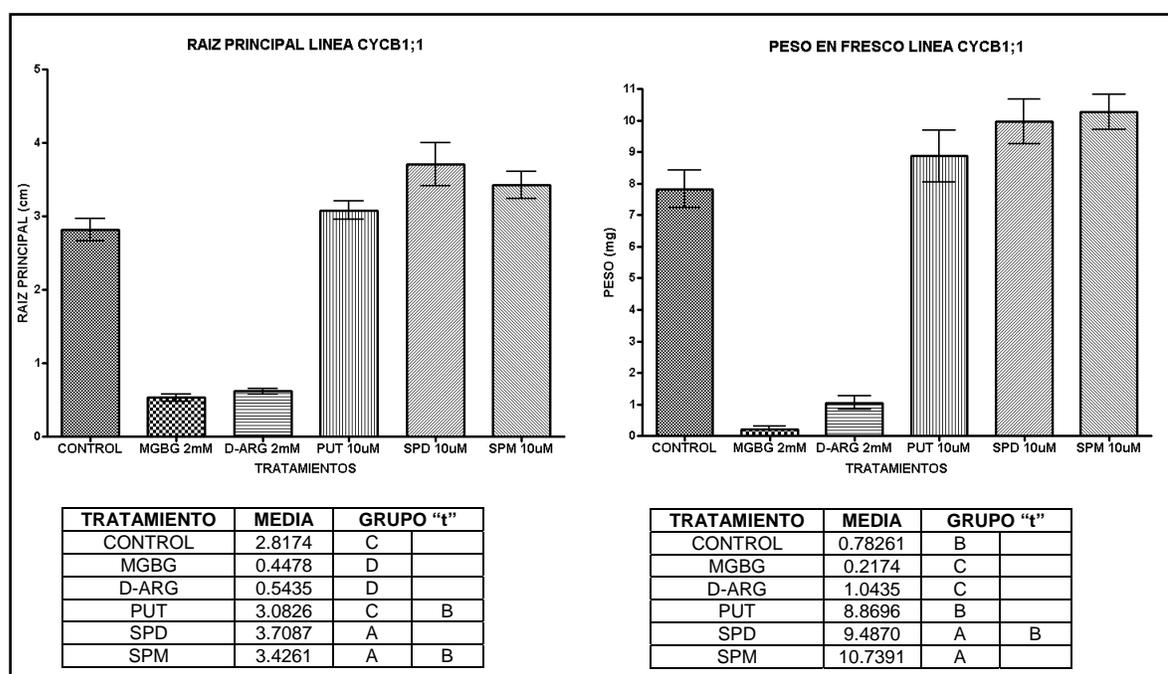


Figura 2. Medición de raíz y determinación del peso fresco en la línea marcadora *CYCB1;1::uidA* de *A. thaliana* bajo tratamientos de Pas e inhibidores. Gráficas de largo de raíz principal (cm) y de peso fresco (mg) de plantas de *Arabidopsis* sometidas a los diferentes tratamientos: con PAs durante 7 días a una concentración de 10 μ M y con inhibidores de PAs, por 2 días a una concentración de 2mM. En las tablas se muestran los datos del análisis estadístico de cada tratamiento la media y el grupo al que corresponde cada tratamiento de acuerdo a la prueba "t" de student ($p > 0.005$). El número de plantas (N), utilizadas fue de 30, para todos los experimentos.

3.2 Efecto de la aplicación exógena de poliaminas y de sus inhibidores en el ciclo celular de Arabidopsis

Con los resultados anteriores se puede inferir que las PAs participan tanto en el crecimiento como el desarrollo de la línea *CYCB1;1::uidA* de Arabidopsis, especialmente en la raíz. Esta línea marcadora *CYCB1;1::uidA* fue empleada para determinar alteraciones en la división celular (Colón-Carmona et al., 1999), presenta un patrón de expresión basal característico localizado en la cofia y partes aéreas de planta donde se está llevando a cabo la transición G2/M del ciclo celular; la señal es observada en el momento específico ya que la proteína GUS tiene fusionado al amino terminal la caja de destrucción de la Ciclina B1.

Interesantemente el patrón de expresión fue más intenso con los tratamientos con PAs y es casi nulo en los tratamientos con los inhibidores. En la Figura 3, se observa como la expresión aumenta en hojas, raíz, cofia y meristemas al someterlos a concentraciones de 10 μM de Put, Spd y Spm en comparación con las plantas control. Otro dato muy interesante, fue observar la expresión del gen reportero en las células estomáticas especialmente con el tratamiento con Spd 10 μM (Fig. 4).



Figura 3. Efecto de la adición de poliaminas sobre la división celular. Se utilizó la línea reportera *CYCB1::uidA* de *Arabidopsis* bajo los tratamientos con PAs durante 7 días a una concentración de 10 μ M. Las imágenes fueron obtenidas en un aumento 4X bajo microscopio Motic.

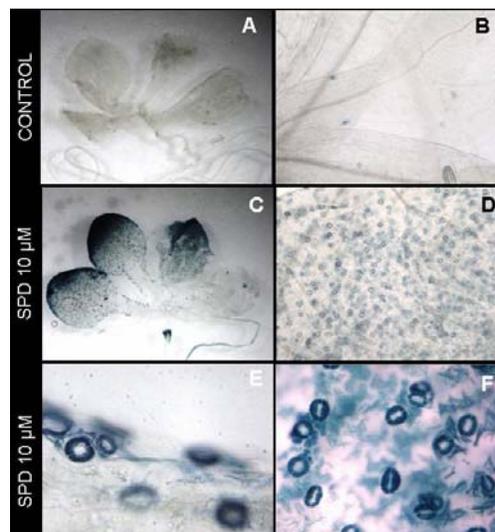


Figura 4. Efecto de la adición exógena de Spd en la línea *CYCB1;1::uidA* de *Arabidopsis*. La línea se trató durante 7 días a una concentración de 10 μ M de Spd. Las imágenes fueron obtenidas bajo estereoscopio (A, C) y microscopio a un aumento 10X (B, D) y de 100X (E, F).

Por otro lado, en la Figura 5, se utilizaron concentraciones crecientes de los inhibidores de la biosíntesis de PAs descritos anteriormente, MGBG y D-ARG, observándose que al aumentar la concentración del inhibidor disminuía de manera proporcional la intensidad del gen reportero del ciclo celular. De igual manera se observó un efecto más fuerte con el inhibidor de la SAMDC (MGBG) que el inhibidor de la ADC (D-ARG).

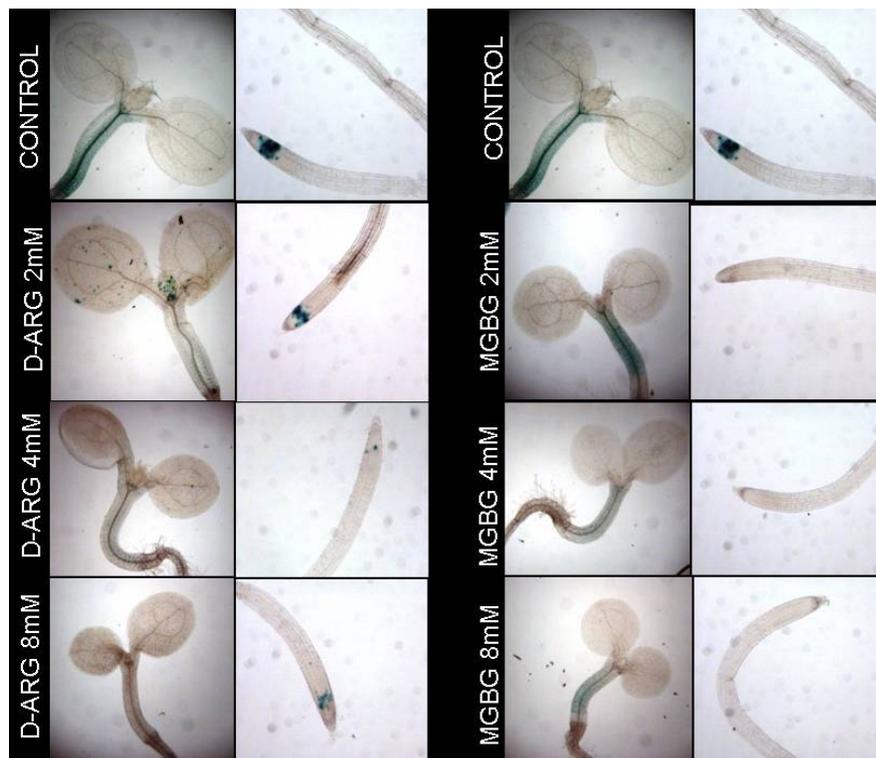


Figura 5. Efecto de los inhibidores de la biosíntesis de poliaminas en la división celular. Se sometió la línea marcadora *CYCB1;1::uidA* de *Arabidopsis* a tratamientos con los inhibidores de la biosíntesis de PAs durante 2 días a una concentración de 2 mM. Las imágenes fueron obtenidas en aumento de 4X bajo microscopio Motic.

3.3 Efecto del estrés salino en el ciclo celular de *Arabidopsis*

En la Figura 6, se muestra el efecto en la expresión del gen reportero GUS bajo condiciones de estrés salino. Cuando aplicamos las concentraciones más altas de NaCl (50 y 75 mM) se visualizó una disminución importante en la expresión del gen reportero en raíces, lo que indica un arresto de la división celular bajo estrés (Fig. 6, E-H). En la parte del meristemo apical también se observa una disminución; sin embargo, no es tan evidente como lo descrito en raíz. De manera interesante, a 25 mM de NaCl se observa un aumento en la expresión de GUS en las zonas que se marcan normalmente con ésta línea: meristemos de raíz, primordios de raíces laterales y meristemo apical (Figura 6, C y D). La estimulación del crecimiento de plantas tratadas con 25 mM de NaCl ha sido observada en nuestro grupo de trabajo al estudiar el efecto del estrés salino en plántulas de frijol, maíz y chile (datos no publicados).

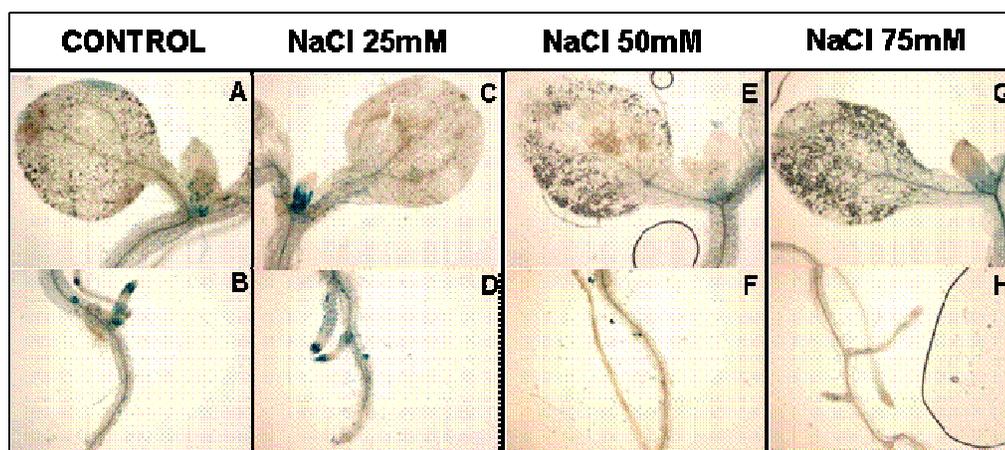


Figura 6. Efecto del estrés salino en la división celular. Se utilizó la línea reportera *CYCB1;1::uidA* de *Arabidopsis* en tratamientos de 25, 50 y 75 mM de NaCl por 2 días. Las imágenes fueron obtenidas en aumento 4X bajo microscopio Leica.

Nuestra siguiente aproximación fue probar el efecto de la adición de PAs bajo condiciones de estrés salino en la línea *CYCB1::uidA*, para observar si las PAs cambian el patrón de inhibición del ciclo celular provocado por el estrés.

Para ello se mezcló por separado cada PA (Put, Spd y Spm) en una concentración de 10 μ M con los tratamientos de salinidad (25, 50 y 75 mM). Como se puede observar en la Figura 7, las PAs revierten el efecto negativo del estrés salino en el patrón de expresión de la línea *CYCB1::uidA*. Por ejemplo con los tratamientos de Spd y Spm se logra casi restablecer el patrón de expresión en todas las concentraciones de NaCl utilizadas, tanto en la parte aérea como en la raíz de las plántulas. En el caso de la aplicación de Put el efecto protector se observa sólo para las concentraciones de 25 y 50 mM en ambas partes de la planta ya que en 75 mM no se logra recuperar el fenotipo de la expresión en raíz, en comparación con el control sin tratamiento.

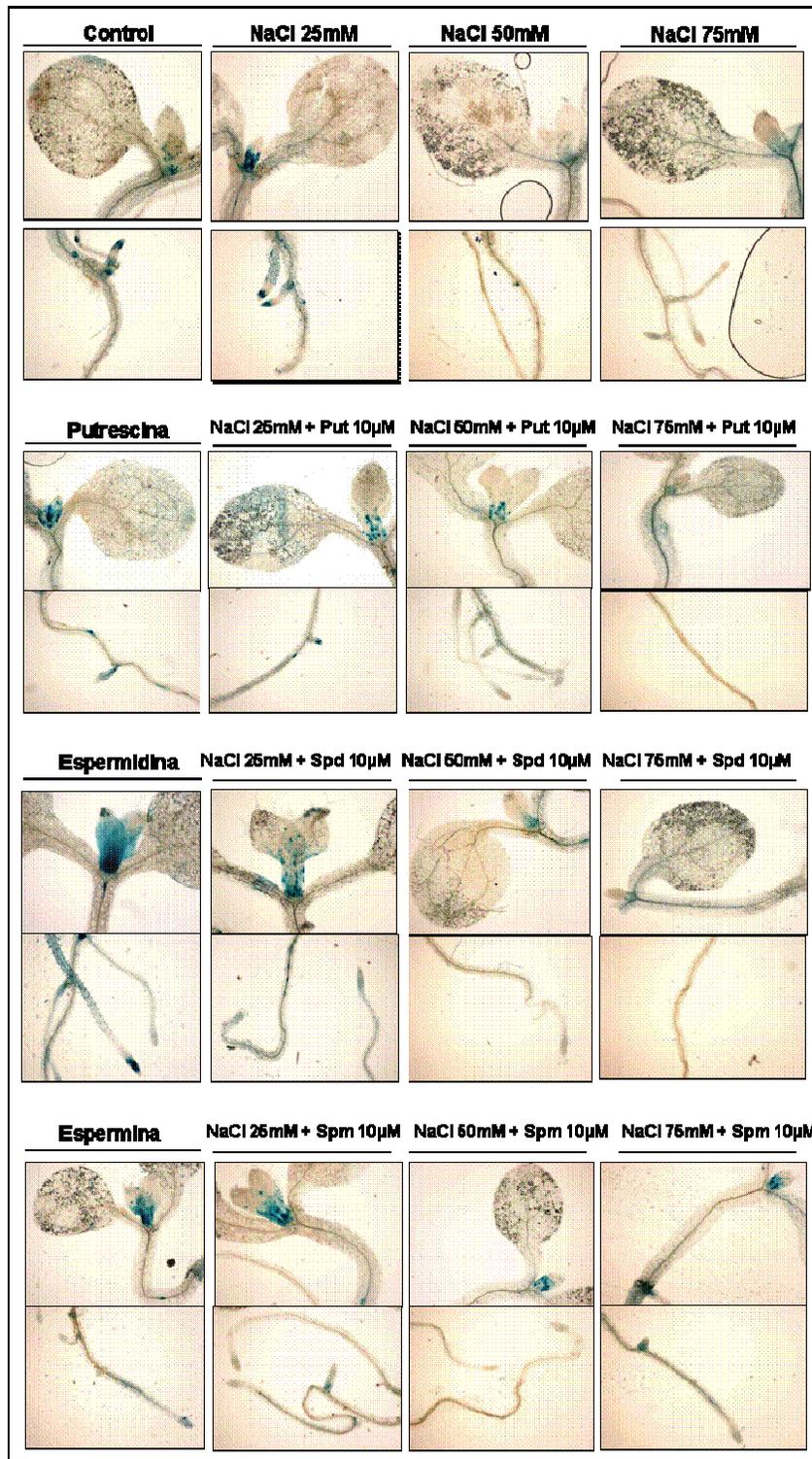


Figura 7. Efecto de las PAs durante el estrés salino en la división celular. Se utilizó la línea reportera *CYCB1;1::uidA* de *Arabidopsis* en tratamientos con PAs de 10 µM, y de PAs más NaCl en concentraciones de 25, 50 y 75 mM por 2 días. Las imágenes fueron obtenidas bajo microscopio Leica, con aumento 4X.

3.4 Efecto de la adición de poliaminas exógenas en la expresión de genes de respuesta a auxinas

Se sabe que al utilizar auxinas, como el ácido indol acético a bajas concentraciones se incrementa el desarrollo de la raíz principal, y con altas concentraciones se promueve la formación de pelos radiculares y raíces laterales (Blakely *et al.*, 1982; Laskowski *et al.*, 1995). Al igual que en la línea *CYCB1;1::uidA*, las PAs presentaron un efecto promotor del crecimiento en la línea *DR5::uidA* (datos no mostrados). Esta línea desarrollada por Ulmasov *et al.*, (1997) en su construcción, consta de 8 bloques repetidos AuxRE, lo cual permite monitorear partes de la planta que presenten una inducción o represión, en la expresión de genes que responden a auxinas mediante el gen reportero GUS.

En la Figura 8 (A, B, C), se aprecia en hojas, tallo y raíz la expresión basal de esta línea. Con el tratamiento de Put no se aprecia una diferencia en la expresión respecto al control, en los diferentes tejidos (hojas, tallo y raíz). Este patrón fue similar al observado en la línea marcadora de ciclo celular al adicionar Put. En cambio, cuando se crecieron en presencia de Spd y Spm se puede observar que la expresión aumenta de manera notoria en todas las partes de la planta, incluyendo de manera interesante las zonas meristemáticas y en los primordios radiculares.

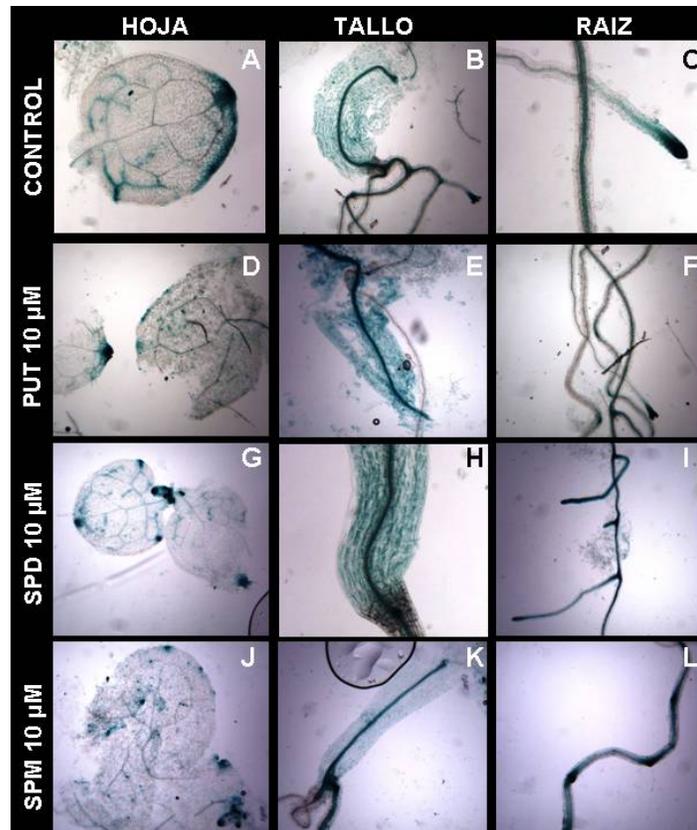


Figura 8. Efecto de la adición poliaminas en la línea reportera *DR5::uidA* de *A. thaliana*. Las plantas se mantuvieron en placas con medio MS conteniendo cada PA a la concentración de 10 μM durante 2 días. Las imágenes fueron obtenidas en aumento 4X bajo Microscopio Motic.

3.5 Efecto de la inhibición de la biosíntesis de poliaminas en la expresión de genes de respuesta a auxinas

Con el fin de analizar el patrón de intensidad de GUS en condiciones de inhibición de PAs, se trataron plántulas de esta línea con los inhibidores MGBG y D-ARG, descritos anteriormente y se analizó la respuesta a auxinas.

En las plantas tratadas con inhibidores (Figura 9 B, C, D, E, F, G) se puede observar que el tamaño de éstas es menor en comparación al control (Figura 9A), así como la intensidad del gen reportero. Para el caso de MGBG (Figura 9 B, C,

D), el patrón de expresión del gen reportero fue el más afectado, no así para el inhibidor D-ARG en donde las plantas presentaron únicamente una disminución en el crecimiento.

Con estos resultados podemos inferir que la expresión de genes inducida por auxinas, debido a la disminución del gen reportero con el inhibidor MGBG así como la inhibición del crecimiento de las plantas, está relacionada de manera más estrecha con la síntesis de PAs superiores Spd y Spm.

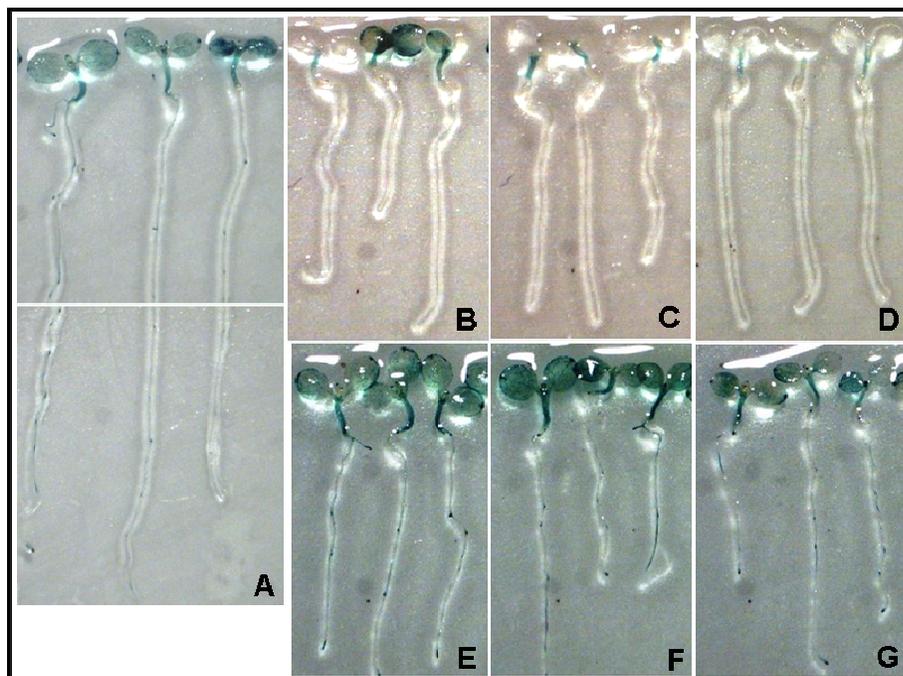


Figura 9. Efecto de los inhibidores de la biosíntesis de poliaminas en la línea mutante *DR5::uidA* de *A. thaliana*. Las plantas se mantuvieron en placas de medio MS con concentraciones de 2, 4 y 8 mM de cada inhibidor por separado, MGBG y D-ARG durante 2 días. En la foto A se observan las plantas sin tratamiento, en las fotografías B, C y D los tratamientos con MGBG a 2, 4 y 8 mM respectivamente; en las fotografías E, F y G se muestran las plantas tratadas con D-ARG a 2, 4 y 8 mM, respectivamente. Las fotografías fueron tomadas en aumento 10X en un Estereoscopio Motic.

3.6 Obtención de líneas reporteras de ciclo celular y de respuesta de expresión de genes inducidos por auxinas con mutantes en *adc1^{-/-}/adc2^{-/-}*

Existen reportes que establecen que la producción de Put en Arabidopsis depende directamente de la enzima ADC (Hanfrey *et al.*, 2001). Los resultados descritos en apartados previos demuestran que al inhibir la biosíntesis de PAs en la línea marcadora de ciclo celular, *CYCB1;1::uidA*, empleando los inhibidores MGBG y D-ARG, se reprime la expresión de GUS indicando que las PAs participan de manera directa en la división celular. El generar líneas marcadoras del ciclo celular con la actividad ADC disminuida en un fondo mutante de cada uno de los genes de la ADC, nos daría una mejor aproximación a esta hipótesis. Urano *et al.*, (2005) reportan que la producción de Put disminuye hasta en un 70% respecto al control, en la mutante *adc2^{-/-}*, en cambio en la mutante *adc1^{-/-}* la producción de Put no sufrió cambios, sugiriendo la importancia de la enzima ADC2 en la producción de Put.

Para ello se realizó la cruce de la línea *CYCB1;1::uidA* con cada una de las mutantes homocigotas para los genes *adc1^{-/-}* y *adc2^{-/-}* de Arabidopsis (Urano *et al.*, 2004), asimismo con la línea *DR5::uidA*.

Hasta el momento se ha logrado la obtención de líneas heterocigotas para cada uno de los genes ADC (1 y 2) y las respectivas líneas marcadoras (que expresan GUS) en la generación F1 (datos no mostrados). La caracterización de líneas (F2) homocigotas para *adc1^{-/-}* y *adc2^{-/-}* (GUS +) se encuentra en proceso.

IV. DISCUSIÓN

Participación de las PAs en el desarrollo de Arabidopsis

Las poliaminas (PAs) están ampliamente distribuidas en todos los organismos; la putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm) son las más abundantes en plantas. Existen numerosas evidencias que las relacionan con un gran número de procesos biológicos esenciales, como la proliferación celular, crecimiento, morfogénesis, diferenciación y programación de la muerte celular (Kumar *et al.*, 1997; Malmberg *et al.*, 1998; Serafini-Fracassini *et al.*, 2002). En 1985 Galston *et al.*, demostraron la correlación del incremento en los niveles de Put con el crecimiento de la raíz de chícharo. En *Pinus virginia* la aplicación exógena de poliaminas en concentraciones de 0.001 mM incremento la formación así como la elongación y el crecimiento de raíces (Tang y Newton, 2005). En *Arabidopsis* al utilizar concentraciones menores a 1 mM de PAs el crecimiento de la raíz es estimulado, de manera opuesta se encontró que el crecimiento de la raíz se inhibe al tratarla con altas concentraciones de PAs (Mirza y Bagni, 1991). Efectos similares han sido obtenidos por nuestro grupo de trabajo en plantas de frijol, chile, maíz entre otras, sugiriendo que los efectos de las PAs son dosis dependientes y que concentraciones elevadas muestran efectos tóxicos según la especie (datos no publicados). Asimismo, en el presente trabajo de tesis, se observó que en el tratamiento con PAs en concentraciones de 10 μ M se promueve el crecimiento de la raíz de las plantas de *Arabidopsis* respecto a las plantas control (Figura 1). El mayor efecto en la elongación de la raíz principal y de peso

fresco se obtuvo al utilizar Spd (3.70 cm, 10.7391 mg en promedio) una poliamina sintetizada a partir de Put en parte por acción de la enzima SAMDC (Figura 2). Por otro lado, la inhibición de la ruta de biosíntesis de PAs demostró la importancia de estas aminas en el crecimiento de la raíz y en el aumento del peso fresco de *Arabidopsis*. Al utilizar concentraciones de 2 mM de los inhibidores MGBG y D-ARG, el crecimiento de la línea *CYCB1;1::uidA* se detiene, observando un daño más severo con el inhibidor MGBG, el cual bloquea a la enzima SAMDC, y por consecuencia disminuyen los niveles de Spd y Spm.

Relación de las PAs con el ciclo celular en plantas

En protoplastos de avena las PAs estimularon la síntesis de ADN y el inicio de la actividad mitótica, se ha descrito que durante el ciclo celular existen aumentos en los niveles de PAs y de enzimas clave en la biosíntesis de las mismas, en las transiciones G1/S y G2/M (Galston *et al.*, 1978; Kaur-Sawhney *et al.*, 1980). En mamíferos se ha descrito que la Put aumenta en las fases S y G2, la Spm en las fases G1 y S, mientras que la Spd se incrementa durante todo el ciclo celular (Wallace *et al.*, 2003). Asimismo, en levaduras se ha reportado que la acumulación de PAs en la fase G1 del ciclo celular juega un papel importante en la modulación de los niveles de ciclinas mitóticas como las del tipo “B”, las cuales deben ser degradadas en la fase G1. Estos resultados se han demostrado con el uso de inhibidores como DFMO, y la aplicación de PAs de manera exógena (Thomas y Thomas, 1994).

El ciclo celular es un punto de control fundamental tanto en el crecimiento como en el desarrollo que a su vez está regulado por complejos de cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), ciclinas, inhibidores de ciclinas, factores de transcripción E2F/DP y cinasas WEE. Éste abarca cuatro fases secuenciales, desde la replicación del material genético hasta la segregación de los cromosomas en dos células hermanas (Dewitte y Murray, 2003). Muchas ciclinas están reguladas diferencialmente por citocininas, brasinoesteroides y poliaminas (De Veylder *et al.*, 1999; Riou-Khamlichi *et al.*, 2000). Estas ciclinas se dividen en dos grupos: mitóticas que participan en la transición G2/M y las ciclinas tipo G1 que inician la transición G1/S. Las ciclinas mitóticas cuentan con un motivo conocido como caja de destrucción que implica su degradación por la vía proteolítica de la ubiquitina/proteosoma 26S al iniciar el proceso de mitosis (Glotzer *et al.*, 1991). Esta característica fue tomada para la construcción de la línea marcadora *CYCB1;1::uidA* que monitorea eventos de división celular de forma espacio-tiempo dependiente en *Arabidopsis* (Colón-Carmona *et al.*, 1999). Los tratamientos con PAs exógenas en concentraciones de 10µM aumentaron la división celular al observar que el patrón de expresión del gen reportero es más intenso en todas las partes de la planta respecto al control, es decir se encontró un aumento en los eventos de mitosis en hojas, tallo, raíz y en la cofia (Figura 3). El efecto antagónico (Figura 4) se logró al aplicar concentraciones crecientes de los inhibidores, MGBG y D-ARG, donde se observó un efecto más fuerte con el inhibidor de la SAMDC (MGBG) enzima involucrada con la producción de Spd y Spm. Se ha descrito que líneas mutantes de *Arabidopsis* que no sintetizan Spd (deficientes en espermidina sintasa) mostraron un fenotipo letal (Imai *et al.*, 2004b); de manera opuesta al

sobreexpresar el gen de la espermidina sintasa las plantas de *Arabidopsis* fueron tolerantes a múltiples tipos de estrés como frío, congelamiento, salinidad, sequía y toxicidad por paraquat (Kasukabe *et al.* 2004). Esto concuerda con lo encontrado en nuestro trabajo donde la producción de Spd es importante para el desarrollo normal de *Arabidopsis*.

Estrés salino y ciclo celular

Bajo estrés salino se ha reportado que existe una disminución en la tasa de crecimiento (Munns, 2002) esto coincide con lo observado en la línea reportera *CYCB1;1::uidA* de *Arabidopsis* al someterla a concentraciones de 50 y 75 mM de NaCl (Figura 5). Bajo estas condiciones la expresión de GUS disminuye presentando un daño más severo en la arquitectura de las plantas; existiendo una evidente disminución en la tasa de división celular. A nivel molecular, se ha propuesto una importante conexión entre estrés (salino e hídrico) y ciclo celular en *Arabidopsis*, donde la inducción de ICK1 por ABA juega un papel esencial (Wang *et al.*, 1998). ICK1, codifica un inhibidor de protein cinasas dependiente de ciclina, el cual impide o bloquea la progresión del ciclo celular al reducir la actividad de cinasas dependientes de ciclinas. Por lo tanto, la inducción de ICK1 mediada por ABA durante un estrés salino podría regular directamente al ciclo celular. Asimismo, se ha propuesto que el estrés ejerce un efecto sobre ciclo celular al regular transcripcional o post-transcripcionalmente otros componentes de la maquinaria del ciclo celular, adicionales a ICK1.

Por otro lado, de manera interesante en la concentración de 25 mM se observó un aumento en la expresión del gen reportero GUS dando evidencia de que bajas concentraciones de sales pudieran estimular el ciclo celular. Huang y Van Steveninck (1990) demostraron que la presencia de NaCl aumenta el proceso de vacuolización en la raíz, estrategia usada por la planta para reducir el efecto tóxico del estrés salino. Nuestro grupo de investigación también ha observado que a concentraciones bajas (25mM de NaCl) en plantas de maíz y frijol existe una estimulación del crecimiento de la raíz (datos no publicados).

Efecto de las PAs en el estrés salino y ciclo celular de Arabidopsis

Distintos grupos de investigación han reportado un incremento en el contenido de PAs durante un estrés salino (Erdei *et al.*, 1996; Basu *et al.*, 1998; Kasinathan y Wingler, 2004; Jiménez Bremont *et al.* 2007; Hernández-Lucero *et al.*, 2008). Sin embargo, la función directa de las PAs en la tolerancia al estrés ha sido difícil de demostrar. La generación de mutantes deficientes en genes de biosíntesis de PAs, como la ADC han demostrado que una disminución en la síntesis de Put y PAs en general afecta la tolerancia al estrés salino en Arabidopsis (Kasinathan y Wingler, 2004). Zhao y Qin (2004) encontraron que en plantas de cebada tratadas con NaCl se afecta la estabilidad de la membrana al reducir la cantidad de fosfolípidos, al aplicar Put o Spd se restaura la integridad de la membrana y asimismo la tolerancia al estrés salino. En nuestro trabajo encontramos de manera interesante que las PAs restauran el proceso de división

celular durante un estrés salino, encontrando una conexión interesante de su función bajo estrés (Figura 6).

Efecto de las PAs en la expresión génica inducida por auxinas

Las auxinas son hormonas que participan en el crecimiento y desarrollo de las plantas, específicamente en procesos como el desarrollo y formación de raíces al regular la expresión de genes relacionados con estos procesos (Blakely *et al.*, 1982). Un gen de respuesta auxinas, GH3, aislado de soya contiene en su región promotora elementos de respuesta a auxinas (AuxREs). Esta región ha sido fusionada al gen GUS creando una línea reportera de compuestos tipo auxina (Ulmasov *et al.*, 1997). Dicha línea fue utilizada en este trabajo para elucidar la posible conexión entre las PAs y los compuestos tipo auxina. Recientemente, se ha reportado la participación de las PAs en el desarrollo de raíces al igual que las auxinas, considerando a las PAs como un nuevo grupo de reguladores de crecimiento. La relación PAs-auxinas en el desarrollo aún no es clara. Existen reportes que establecen que la aplicación exógena de IBA (análogo de IAA) induce un incremento en los niveles de Put (Friedman *et al.*, 1973; 1985). En procesos como el desarrollo de la raíz se ha propuesto que las PAs y las auxinas tienen un papel en conjunto sobre la regulación de los eventos tempranos del desarrollo de raíces adventicias, durante la división celular y formación del primordio (Nag *et al.*, 2001) Por otro lado, durante el desarrollo de frutos de chícharo y jitomate, se ha reportado que los niveles de mRNA y las actividades enzimáticas de ADC y ODC incrementan por tratamiento con giberelinas, auxinas

y citocininas (Pérez-Amador y Carbonell, 1995; Pérez-Amador *et al.*, 1995; Alabadi *et al.*, 1996, Alabadi y Carbonell, 1998).

En nuestro trabajo se demuestra que al aplicar PAs de manera exógena en concentraciones de 10 μ M la respuesta génica inducida por auxinas se ve incrementada a nivel de hojas, tallo y raíces. Asimismo, al inhibir la biosíntesis de Spd y Spm con MGBG (Figura 5) el marcador de respuesta a auxinas y el crecimiento de Arabidopsis se observaron afectados. El efecto de MGBG fue aún más dramático que el empleo de D-ARG, que afecta la producción de Put. Por lo tanto, la línea celular empleada DR5 nos permitió encontrar una conexión directa entre PAs y auxinas en el desarrollo de Arabidopsis.

V. REFERENCIAS

- Alabadí D, Agüero MS, Perez-Amador MA, Carbonell J (1996) Arginase, arginine decarboxylase, ornithine decarboxylase, and polyamines in tomato ovarios. *Plant Physiol* 112:1237-1244.
- Alabadí D, Carbonell J (1998) Expression of ornithine decarboxylase is transiently increased by pollination, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and gibberellic acid in tomato ovaries. *Plant Physiol* 118: 323–328.
- Alcázar R, García-Martínez JL, Cuevas JC, Tiburcio AF, Altabella T (2005) Overexpression of ADC2 in Arabidopsis induces dwarfism and late-flowering through GA deficiency. *Plant J.* 43: 425-436.
- Basu HS, Marton LJ (1995) Biological and therapeutic implications of the effects of polyamines on chromatin condensation. In *Polyamines: Regulation and Molecular Interaction* (Casero R, ed.) 101-128. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Basu R, Maitra N, Gosh B (1988) Salinity results in polyamine accumulation in early rice (*Oriza sativa L.*) seedlings. *Aust J Plant Physiol* 16:777–786.
- Blakely LM, Durham M, Evans TA, Blakely RM (1982) Experimental studies on lateral root formation in radish seedling roots: general methods, developmental stages, and spontaneous formation of lateral roots. *Bot Gaz* 14: 341–352.
- Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J (1999) Polyamines and plant environmental challenges: recent development. *Plant Sci.* 140: 103-125.
- Busó E, Collado MT, Marco F, La fuente T, Carrasco P (2006) Los niveles de espermina median la respuesta a estreses abióticos dependiente de ABA. In: Gómez-Cadenas A, García-Agustín P (eds) *Fitohormonas: metabolismo y modo de acción*. X Simposio sobre Metabolismo y Modo de Acción de las Fitohormonas, Benicassim, April 2006. *Ciencias experimentals vol 8*. Publicacions de la Universitat Jaume I, Castellon de la Plana, 323–330. ISBN 84-8021-561-5.

- 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(4):503-508.
- De Veylder L, De Almeida Engler J, Burssens S, Manevski A, Lescure B, Van Montagu M, Engler G, Inze D (1999) *Planta* 208:453-462.
- Dewitte W and Murria JAH (2003) The plant cell cycle. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54:235-264.
- Erdei L, Szegletes Z, Barabas K, Pestenacz A (1996) Responses in polyamine titer under osmotic and salt stress in sorghum and maize seedlings. *J Plant Physiol* 147:599–603.
- Feirer RP, Hocking KL, Woods PJ (1997) Involvement of arginine decarboxylase in the response of *Arabidopsis thaliana* to osmotic stress. *J. Plant Physiol.* 153:733-738.
- Friedman RA, Altman A, Bachrach U (1973) Adventitious root formation in hypocotyl cuttings in relation to IAA translocation and hypocotyl anatomy. *J Exp Bot* 30:769-777.
- Friedman RA, Altman A, Bachrach U (1985) Incorporation of precursors into polyamines II. *Plant Physiology* 79:80-83.
- Galston AW, Altman A, Kaur-Sawhney R (1978) Polyamines, ribonuclease and the improvement of oat leaf protoplasts. *Plant Sci Lett* 11:69-79.
- Glotzer M, Murria AW, Kirschner MW (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349:132-138.
- Hanfrey C, Sommer S, Mayer MJ, Burtin D, Michael AJ (2001) *Arabidopsis* polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity. *The Plant J* 27:551-560.
- Hernández-Lucero E, Ruiz OA, Jiménez-Bremont JF (2008) Effect of salt stress on polyamine metabolism in two bean cultivars. *Plant Stress* 2:96-102.
- Huang CX, Van Steveninck RFM (1990) Salinity induced structural changes in meristematic cells of barley roots. *New Phyto.* 115:17-22.

- Hummel I, Bourdais G, Gouesbet G, Coueé I, Malmberg RL, Amrani AE (2004) Differential gene expression of arginine decarboxylase ADC1 and ADC2 in *Arabidopsis thaliana*: characterization of transcriptional regulation during seed germination and seedling development. *New Phytol.* 163:519-531.
- Illingworth C, Mayer MJ, Elliott K, Hanfrey C, Walton NJ, Michael AJ (2003) The diverse bacterial origins of the *Arabidopsis* polyamine biosynthetic pathway. *FEBS Lett.* 549:26–30.
- Imai A, Akiyama T, Kato T, Sato S, Tabata S, Yamamoto KT, Takahashi T (2004b) Spermine is not essential for survival of *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* 556:148–152.
- Imai R, Ali A, Pramanik HR, Nakaminami K, Sentoku N, Kato H (2004^a) A distinctive class of spermidine synthase is involved in chilling response in rice. *J. Plant Physiol.* 161: 883-886.
- Janowitz T, Kneifel H, Piotrowski M (2003) Identification and characterization of plant agmatine iminohydrolase, the last missing link in polyamine biosynthesis of plants. *FEBS Lett.* 544:258–261.
- Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant. Mol. Biol.* 5:387-405.
- Jiménez-Bremont JF, Camacho-Villasana YM, Cabrera-Ponce JL, Barba de la Rosa AP, Ochoa-Alejo N (2004) Sequence comparison of plant ornithine decarboxylases reveals high homology and lack of introns. *Biol Planta.* 48:193-198.
- Jiménez-Bremont JF, Ruiz OA, Rodríguez-Kessler M (2007) Modulation of spermidine and spermine levels in maize seedlings subjected to long-term salt stress. *Plant Physiol. and Bioch.* 45:812-821.
- Kakkar RK, Sawhney VK (2002) Polyamine research in plants a changing perspective. *Physiol. Plant.* 116:281-292.
- Kasinathan V, Wingler A (2004) Effect of reduced arginine decarboxylase activity on salt tolerance and on polyamine formation during salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 121:101–107.

- Kasukabe Y, He L, Nada K, Misawa S, Ihara I, Tachibana S (2004) Over-expression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 45:712-722.
- Kaur-Sawhney R, Flores HE, Galston AW (1980) Polyamine-induced DNA synthesis and mitosis in oat leaf protoplasts. *Plant Physiol.* 65:368-371.
- Kumar A, Altabella T, Taylor MA, Tiburcio AF (1997) Recent advances in polyamine research. *Trends Plant Sci.* 2:124-130.
- Laskowski MJ, Williams ME, Nusbaum HC, Sussex IM (1995) Formation of lateral root meristems is a 2-stage process. *Development* 121:3303–3310.
- Malmberg RL, Watson MB, Galloway GL, Yu WL (1998) Molecular genetics analysis of plant polyamines. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17:199-224.
- Mirza JI, Bagni N (1991) Effects of exogenous polyamines and difluoromethylornithine on seed germination and root growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Reg.* 10:163-168.
- Munns R (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell and Environment.* 25:239-250.
- Murashige T and Skoog F. 1962. Arevised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nag S, Saha K, Choudhuri MA (2001) Role of auxin and polyamines in adventitious root formation in relation to changes in compounds involved in rooting. *J. Plant Growth Regul.* 20:182–194.
- Ochoa-Alfaro AE, Silva-Ortega CO, Becerra-Flora A, Flores-Rivas J y Jimenez-Bremont JF (2008) Effect of salt Stress, proline, and polyamines on seed germination of *Opuntia streptacantha*. *J. PACD.* 10:56-70.
- Perez-Amador MA, Carbonell J (1995) Arginine decarboxilase and putrescine oxidase in ovaries of *Pisum sativum L.* Changes during ovary senescence and early stages of fruit development. *Plant Physiol* 107:865-872.

- Perez-Amador MA, Carbonell J, Granell A (1995) Expression of arginine decarboxylase is induced during early fruit development and in young tissues of *Pisum sativum* (L.). *Plant Mol Biol* 28:997-1009.
- Piotrowski M, Janowitz T, Kneifel H (2003) Plant C–N hydrolase and the identification of plant N-carbamoylputrescine amidohydrolase involved in polyamine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 278:1708–1712.
- Riou-Khamlichi C, Menges M, Healy JMS, Murray JAH (2000) Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of Arabidopsis D-type cyclin gene expression. *Mol and Cell Biol* 20:4513-4521.
- SAS Institute (2005) SAS/STAT user's guide. Versión 8.2. SAS Inst., Cary, NC, USA.
- Serafini-Fracassini D, Del Duca S, Monti F, Poli F, Sacchetti G, Bregoli AM, Biondi S, Della Mea M (2002) Transglutaminase activity during senescence and programmed cell death in the corolla of tobacco (*Nicotiana tabacum*) flowers. *Cell Death and Differentiation* 9:309–321.
- Tang W, Newton RJ (2005) Polyamines reduce salt-induced oxidative damage by increasing the activities of antioxidant enzymes and decreasing lipid peroxidation in Virginia pine. *Plant Growth Regulation* 46: 31-43.
- Thomas T, Thomas TJ (1994) Regulation of Cyclin B1 by Estradiol and Polyamines in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Cancer Research* 54:1077-1084.
- Tiburcio AF, Altabella T, Borrel A, Masgrau C (1997) Polyamine metabolism and its regulation. *Physiol Plant* 100:664–674.
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ (1997) Aux/ IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9: 1963–1971.
- Urano K, Hobo T, Shinozaki K (2005) Arabidopsis ADC genes involved in polyamine biosynthesis are essential for seed development. *FEBS Letters* 579:1557-1564.

- Urano K, Yoshiba Y, Nanjo T, Igarashi Y, Seki M, Sekiguchi K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2003) Characterization of Arabidopsis genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages. *Plant Cell Environ.* 26: 1917-1926.
- Urano K, Yoshiba Y, Nanjo T, Ito T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2004) Arabidopsis stress-inducible gene for arginine decarboxylase AtADC2 is required for accumulation of putrescine in salt tolerance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313: 369-375.
- Vandepoele K, Raes J, De Veylder L, Rouzé P, Rombauts S, Inzé D (2002) Genome-Wide Analysis of Core Cell Cycle Genes in Arabidopsis. *The Plant Cell* 14:903–916.
- Walden R, Cordeiro A, Tiburcio AF (1997) Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. *Plant Physiol.* 113: 1009-1013.
- Wallace HM, Fraser AV, Hughes A (2003) A perspective of polyamine metabolism. *Biochem. J.* 376:1–14
- Wang H, Qi Q, Schorr P, Cutler AJ, Crosby WL, Fowke LC (1998) ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from Arabidopsis thaliana interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *The Plant Journal* 15:501–510.
- Zhao FG, Qin P (2004) Protective effect of exogenous polyamines on root tonoplast function against salt stress in barley seedlings. *Plant Growth Regul* 42:97–103.