

00581

2
2aj

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"MECANISMO DE ACCION DE LAS AUXINAS EN EL MAIZ"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)

PRESENTA

LAURA JOSEFINA PEREZ FLORES

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

| | | |
|----------|--|----|
| I | INTRODUCCION | 1 |
| | -Hipótesis. | |
| | -Objetivos. | |
| | -Diseño Experimental. | |
| II. | ANTECEDENTES | 6 |
| II.1 | Fitorreguladores. | |
| II.1.1 | Definición y Clasificación. | |
| II.1.2 | Efectos de las auxinas. | |
| II.2 | Mecanismo y modo de acción de las auxinas. | |
| II.2.1 | Regulación de la síntesis de proteínas por auxinas. | |
| II.2.2 | Regulación de los niveles de RNA mensajeros por auxinas. | |
| II.2.3 | Receptores de auxinas. | |
| II.3 | Segundos mensajeros en plantas. | |
| II.3.1 | AMP cíclico en plantas. | |
| II.3.2 | Calcio-calmodulina en plantas. | |
| II.3.3 | Inositol-trifosfato. | |
| II.4 | Fosforilación de proteínas en plantas. | |
| III | MATERIALES Y METODOS | 37 |
| III.1 | Materiales. | |
| III.2 | Métodos. | |
| III.2.1 | Preparación del material biológico. | |
| III.2.2 | Preparación de los medios de incubación. | |
| III.2.3 | Incubación de los ejes embrionarios de maiz. | |
| III.2.4 | Obtención de las proteínas del sobrenadante posribosomal. | |
| III.2.5 | Separación de las proteínas del sobrenadante posribosomal mediante cromatografía de filtración en gel. | |
| III.2.6 | Obtención del lisado de reticulocito de conejo. | |
| III.2.7 | Complementación del lisado de reticulocito de conejo. | |
| III.2.8 | Lisado de reticulocito de conejo dependiente de ribosomas exógenos. | |
| III.2.9 | Tratamiento del lisado de reticulocito de conejo con nucleasa micrococcal. | |
| III.2.10 | Aislamiento de ribosomas funcionales de maiz. | |

| | | |
|----------|--|----|
| III.2.11 | Cálculo del rendimiento de ribosomas de maiz. | |
| III.2.12 | Tratamiento de los ribosomas funcionales de maiz con nucleasa micrococcal. | |
| III.2.13 | Sistema de síntesis de proteínas in vitro. | |
| III.2.14 | Determinación de la K_m para poli-U de ribosomas de maiz tratados y sin tratar con auxinas. | |
| III.2.15 | Determinación de la K_m para ribosomas de maiz tratados y sin tratar con auxinas, con poli-U como mensajero exógeno. | |
| III.2.16 | Determinación del error en la traducción de poli-U en ribosomas de maiz tratados y sin tratar con auxinas. | |
| IV | RESULTADOS. | 55 |
| V | DISCUSION. | 77 |
| VI | BIBLIOGRAFIA. | 81 |

RESUMEN

En el presente trabajo se presenta un estudio sobre el mecanismo de acción de las auxinas, usando como modelo la desdiferenciación celular de ejes embrionarios de maiz en los que las auxinas inducen la formación de callos.

Al estudiar el efecto de la auxina sintética MCPP (ácido 2-natil-4-clorofenoxipropiónico) a nivel molecular, se encontró que este sistema responde a las auxinas de manera similar a lo descrito por otros autores en otros tejidos: alterando los patrones de proteínas sintetizadas en el citoplasma. El MCPP presentó también un efecto postranscripcional, consistente en el estímulo de la fosforilación de proteínas celulares. Se encontró que este efecto es solamente cuantitativo, ya que incrementa la fosforilación de las proteínas normalmente fosforiladas en el tejido control, sin cambiar sensiblemente el patrón general de fosfoproteínas. En la fracción ribosomal se encontró que las auxinas estimulan fuertemente la fosforilación de las proteínas ribosomales (aproximadamente 70%). Este efecto no es general para todas las proteínas ribosomales, ya que sólo unas cuantas se encontraron marcadas. El estudio cinético de la fosforilación de las proteínas ribosomales por la acción de las auxinas parece indicar que aceleran el recambio de las proteínas fosforiladas y/o un proceso de intercambio activo de las proteínas fosforiladas en el ribosoma con sus homólogas desfosforiladas. Por otra parte, se encontró que la auxina sintética parece tener un efecto cualitativamente diferente del de la auxina nativa en la fosforilación de las proteínas ribosomales. El efecto funcional de la fosforilación de los ribosomas se puso de manifiesto en un sistema de traducción in

vitro. Se encontró que los ribosomas control tienen diferente K_m para el mensajero sintético poli-U, que los ribosomas de tejidos tratados con auxinas.

ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| AIA | Acido indolacético |
| ANA | Acido naftalén acético |
| 2,4-D | Acido 2,4-diclorofenoxiacético |
| 2,3-D | Acido 2,3-diclorofenoxiacético |
| MCPP | Acido 2 2-metil-4-clorofenoxi propiónico |
| K_D | Constante de disociación del complejo auxina-receptor |
| MS | Medio de Murashige y Skoog |
| IP_3 | Inositol 1,4,5-trifosfato |
| DAG | Diacylglicerol |
| DE | Desviación estándar |

Parte del material que constituye la presente tesis ha sido publicado o ha sido enviado para publicación en:

- 1) Pérez, L. & Sánchez de Jiménez, E. (1986) Auxin modulation of protein synthesis and protein phosphorylation during seed germination F49. J. of Cell. Biochem. Suppl. 10B pp24
- 2) Pérez, L., Aguilar, P. and Sánchez de Jiménez, E. (1987) Effect of an exogenous auxin on maize tissues. Alteration of protein synthesis and phosphorylation. Physiol. Plantarum 69: 517-522.
- 3) Pérez, L. and Sánchez de Jiménez, E. Auxin induction of ribosomal protein phosphorylation, enviado a Plant Physiology.

I. INTRODUCCION

Las auxinas son un grupo de reguladores del crecimiento vegetal que tienen diversos efectos en el crecimiento y desarrollo de las plantas tales como elongación, morfogénesis, división celular, diferenciación celular, etc. La auxina natural es el ácido indol-3-acético (AIA) (1).

A nivel molecular varios grupos de investigadores han encontrado, en distintos sistemas, que las auxinas alteran los patrones de las proteínas sintetizadas y se ha observado que hay algunas (denominadas reguladas por auxinas) que se estimulan, en tanto que otras se inhiben en presencia de dicho fitorregulador (2,3).

El desarrollo de sistemas de traducción *in vitro* para ARN mensajeros, así como el análisis de las proteínas traducidas por medio de electroforesis bidimensional y la tecnología del ADN recombinante, han permitido establecer que la acción de las auxinas a tiempos cortos se relaciona con los procesos transcripcional y postranscripcional. Recientemente han aparecido dos revisiones críticas de la bibliografía acerca de la regulación de la expresión genética por auxinas que han hecho resurgir la hipótesis de la expresión genética propuesta en la década de los 60's (4,5).

En el presente trabajo se ha usado como sistema biológico de estudio a los ejes embrionarios de maiz en germinación. Los tejidos de los ejes embrionarios de maiz tienen un metabolismo basal muy bajo, y al colocarse en un medio con humedad y temperatura adecuadas, inician una serie de procesos bioquímicos que dan origen al desarrollo de la plántula. La aplicación exógena de auxina a este sistema da por resultado una serie de cambios moleculares que conducen finalmente a la formación de un callo, en lugar de la

plántula (6).

Estudios previos en nuestro laboratorio mostraron que este sistema posee proteínas de alta afinidad por auxinas, en el sobrenadante postribosomal. Entre estas proteínas se esperaría encontrar al receptor auxínico. La K_D que se encontró para la unión de esta fracción proteica al [^{14}C]-2,4-D fue de 1×10^{-6} M, valor que está en el rango reportado para otros receptores de auxinas (7,8). Asimismo se encontró que a nivel molecular este sistema responde a las auxinas de manera similar a la descrita por otros autores, es decir, alterando los patrones de proteínas sintetizadas en el citoplasma.

Con base en lo anterior surgió la pregunta ¿A través de cuál mecanismo pueden las auxinas regular tantos procesos fisiológicos y producir tantos cambios en las proteínas sintetizadas como respuesta a su estímulo?.

En organismos animales, muchas hormonas ejercen su acción mediante la fosforilación-desfosforilación de proteínas funcionales (9,10). En plantas se ha sugerido que los fitorreguladores pueden actuar de manera similar y existen reportes previos de que algunas proteínas se fosforilan en respuesta a la acción de las auxinas (11). Como una primera aproximación se pensó en la posibilidad de que la alteración de los patrones de proteínas sintetizadas en presencia de auxinas se debiera a cambios en la fosforilación de ellas, lo que llevaría a un cambio en su carga y consecuentemente en su movilidad electroforética. Para probar esta posibilidad se incubaron ejes embrionarios de maíz con [^{32}P]-ortofosfato en ausencia y presencia de MCPP (auxina sintética, análoga del 2,4-D), y se separó la fracción de proteínas del sobrenadante postribosomal de la fracción ribosomal. El análisis de las proteínas del

sobrenadante postribosomal mediante cromatografía de filtración en gel y electroforesis, reveló que el efecto del MCPP en esta fracción de ejes de maiz es principalmente cuantitativo y de ninguna manera podría explicar todas las alteraciones observadas en los patrones de proteínas sintetizadas. Es de llamar la atención que al analizar la fracción ribosomal en estos experimentos se encontró que el MCPP estimulaba en mayor proporción la fosforilación de dicha fracción.

Con base en los resultados arriba mencionados se propone el modelo de acción de las auxinas en ejes embrionarios de maiz que a continuación se describe (Fig. A).

Hipótesis de trabajo.

Las auxinas interactúan a través de un receptor con la cromatina de las células de los tejidos embrionarios de las semillas de maiz, induciendo la transcripción de algunos ARN mensajeros. Entre dichos mensajeros se encuentran los de algunas proteínas ribosomales y/o el de alguna (s) cinasa (s) de proteínas ribosomales. En consecuencia, se obtendrían ribosomas fosforilados, los cuales provocarían las siguientes consecuencias:

a) Modificación de la eficiencia y/o selectividad de los ribosomas en la traducción de los ARN mensajeros.

b) Producción de alteraciones en los patrones de proteínas sintetizadas.

c) Se desencadenaría un mecanismo en cascada, debido a los cambios funcionales causados por la modulación de las proteínas (enzimas, receptores, etc.) (Fig. A).

Objetivos:

La hipótesis, al igual que el modelo, son muy amplios y permiten un gran número de aproximaciones experimentales. Sin

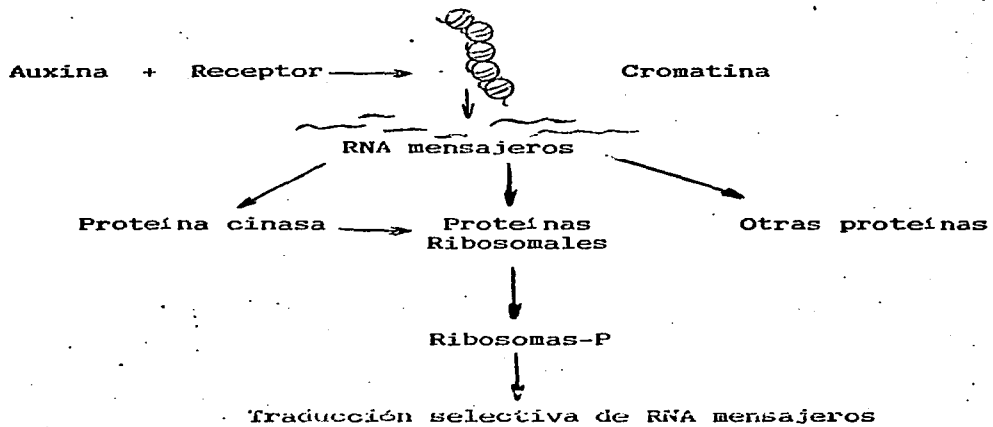


Figura A. Modelo del mecanismo de acción de auxinas.

embargo, en este estudio nos concretamos a abordar algunos objetivos dentro de dicho modelo:

1) Analizar el efecto de las auxinas en la fosforilación de proteínas durante la germinación de maíz.

2) Analizar las proteínas ribosomales fosforiladas normalmente durante la germinación de maíz.

3) Analizar las proteínas ribosomales fosforiladas por efecto de auxinas (natural y sintéticas) durante la germinación de maíz.

4) Estudiar si la fosforilación de las proteínas ribosomales (ribosomas fosforilados) está asociada a cambios en la eficiencia de traducción de estos ribosomas de un mensajero sintético.

5) Estudiar si la fosforilación de las proteínas ribosomales (ribosomas fosforilados) está asociada con un cambio en la fidelidad de traducción de estos ribosomas.

Diseño Experimental.

Se trabajó con maíz (*Zea mays* L.) variedad Chalqueño cosecha 1986 obtenido en PRONASE. Se usaron ejes embrionarios disectados de semillas de maíz, sin incubar e incubados durante 24 h en medio Murashige y Skoog (MS) con y sin auxinas. Las auxinas estudiadas fueron: el ácido 2-[2-metil-4-clorofenoxi]propiónico (MCPP), auxina sintética análogo del 2,4-D, cuyo efecto se comparará con el del ácido indol-3-acético (AIA) que es la auxina natural.

Para determinar si las auxinas incrementan la fosforilación de proteínas, los ejes embrionarios de maíz se imbibieron en medio MS basal (control) o medio MS con auxina (MCPP o AIA) en presencia de [³²P]-ortofosfato. Se separó la fracción ribosomal de la fracción postribosomal de cada tratamiento y se midió la incorporación de ³²P en las proteínas de ambas fracciones.

Para analizar las proteínas ribosomales fosforiladas se

purificaron y se obtuvo el patrón electroforético bidimensional. Mediante fluorografías se localizaron las proteínas fosforiladas en cada uno de los tratamientos anteriores.

Para determinar la eficiencia de los ribosomas se aislaron los ribosomas de cada uno de los tratamientos anteriores y se estudió la cinética de traducción en un sistema de síntesis de proteínas *in vitro*, usando como ARN mensajero un mensaje sintético, el poli-U.

Para estudiar la fidelidad en la traducción se midió la frecuencia de error de dichos ribosomas, mediante la incorporación errónea de [14 C]-leucina en un sistema de síntesis de proteínas *in vitro*, usando como ARN mensajero el mensaje sintético poli-U.

II. ANTECEDENTES.

II.1. Fitorreguladores.

II.1.1. Definición y clasificación.

A pesar de su complejidad, una célula viva funciona con orden y eficiencia. Esta capacidad para coordinar un gran número de actividades se basa en un elaborado sistema de comunicación que permite la supervivencia de la célula en un medio ambiente dinámico. En un organismo pluricelular la comunicación es aún más compleja, ya que cada célula además de coordinar sus propias actividades debe actuar concertadamente con las células vecinas durante el crecimiento y desarrollo del organismo, así como en las respuestas a estímulos del medio ambiente (12)

En las plantas superiores, las células son capaces de interactuar de diversas formas. Existen interacciones físicas mediadas por la presión de turgencia o por señales eléctricas. Sin embargo, las interacciones más conocidas son las mediadas por mensajeros químicos. Entre los compuestos intercambiados se ha distinguido un grupo de moléculas orgánicas, activas en pequeñas cantidades y que coordinan el crecimiento y desarrollo de las plantas. Dichos compuestos se denominaron inicialmente hormonas vegetales o fitohormonas (13).

Los estudios que llevaron al concepto de las fitohormonas y que culminaron en el aislamiento de la primera fitohormona de una planta superior en 1926 se remontan al siglo XVIII. En la literatura de este campo estos compuestos se han definido en términos de su actividad biológica: así, una hormona vegetal es aquella sustancia orgánica distinta a un nutrimento (sustancia que aporta carbono, energía o elementos minerales esenciales), activa en pequeñas concentraciones (a menudo menores a 1 μM), que se forma

en ciertos tejidos y que se transporta a otras partes de la planta. En general, las hormonas vegetales son activas en el tejido que se sintetizan y a distancia, en donde producen respuestas bioquímicas y/o morfológicas específicas (13). En muchos casos varias hormonas distintas comparten una respuesta común. Debido a las diferencias anteriores con las hormonas animales, en años recientes se ha preferido usar el término reguladores del crecimiento vegetal o fitorreguladores en lugar del de hormonas vegetales para designar a estos compuestos.

Se conocen cinco grupos de fitorreguladores que controlan el crecimiento y desarrollo de las plantas: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno y ácido abscísico. Esta clasificación está basada en la naturaleza química, así como en los efectos fisiológicos con los cuales se asociaron originalmente estos compuestos (13).

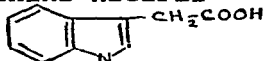
La auxina natural es el ácido indol-3-acético (AIA), aunque se conoce un gran número de compuestos sintéticos que también poseen actividad auxínica, por ejemplo: derivados del ácido indol-acético, ácidos fenoxiacéticos, ácidos arilacéticos, ácidos arilcarboxílicos, ácidos naftoxiacéticos, ácidos picolínicos, ácidos cinámicos, etc. (1) (Figura B).

II.1.2 Efectos de las auxinas.

La aplicación exógena de fitorreguladores a los tejidos vegetales es uno de los métodos más comunes en la investigación de la acción de estas sustancias. Esta estrategia está basada en la idea de que se puede reemplazar la auxina endógena por auxina exógena, de la cual se pueden controlar sus niveles y medir el efecto producido (14).

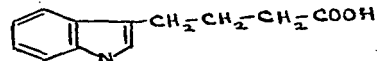
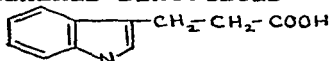
Un problema que se presenta en el estudio de los efectos de

Auxina natural



Acido indolacético

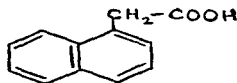
Auxinas sintéticas



Acidos indólicos

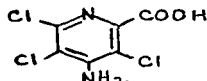
Acido indolpropiónico

Acido indolbutírico



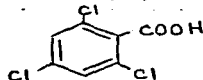
Acidos naftalénicos

Acido naftalén acético



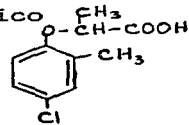
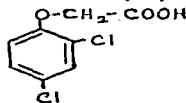
Acidos picolínicos

Acido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico



Acidos arilcarboxílicos

Acido 2,4,6-triclorobenzoico



Clorofenoxiácidos

Acido 2,4-dicloro-fenoxiacético

Acido 2[2-metil-4-cloro-fenoxi] propiónico

Figura B. Estructura química de la auxina natural y algunas auxinas sintéticas

los fitoreguladores es que no existe una separación definitiva entre la(s) célula(s) productora(s) y la(s) célula(s) "blanco". Otra dificultad es que cada célula contiene representantes de todos los fitoreguladores conocidos y estos compuestos interactúan consigo y con el regulador exógeno, de manera distinta dependiendo de sus niveles y del estadio fisiológico en que se encuentre. A pesar de estas dificultades, la aplicación exógena de fitoreguladores a tejidos vegetales es una herramienta poderosa en la investigación de la acción de estos compuestos y su utilización ha permitido avances notables.

Las auxinas tienen efectos muy diversos cuando se aplican a plantas intactas, órganos aislados y células vegetales en cultivo (15). Entre los efectos fisiológicos de las auxinas, estos compuestos regulan: la elongación del tallo, el crecimiento de la raíz, la abscisión de hojas y frutos, el crecimiento de frutos, el crecimiento de yemas laterales, etc. (1). A nivel celular la aplicación de auxinas exógenas es capaz de inducir elongación celular (1,14,16,17,18), la división (1,14,16,17,19) y la diferenciación celular (1,14,16,20,21,22). Con base en lo anterior se sugiere que el ácido indol-3-acético (la auxina natural), regula normalmente procesos del crecimiento y desarrollo de las plantas, que incluyen la elongación, la división y la diferenciación celular.

En general los efectos de las auxinas se dividen en dos categorías principales en función del tiempo de respuesta: las respuestas rápidas a auxina, como la elongación celular (que es una de las más rápidas que se conocen), con un periodo latente de 10-25 minutos (23) y las respuestas de largo-plazo, tales como la división celular y la diferenciación celular con periodos latentes

de horas, e incluso días (24).

II.2.Mecanismo y modo de acción de las auxinas.

Para determinar como actúan los fitorreguladores en las células vegetales, especialmente cuando hay tal diversidad de respuestas, es esencial distinguir entre el mecanismo de acción primario, que se refiere a la(s) reacción(es) inicial(es) disparadora(s) de las respuestas observadas y el modo de acción que está relacionado con la serie de pasos que conducen a las respuestas fisiológicas (13).

Al estudiar el mecanismo de acción de los fitorreguladores surgen varias preguntas que es necesario resolver como son:

-¿Cuál es la naturaleza del (de los) componente(s) celular(es) que percibe(n) al fitorregulador?

-¿Cual es la contribución del estado fisiológico de las células blanco en la respuesta al fitorregulador?

-Las diversas respuestas observadas al aplicar el fitorregulador ¿Revelan uno o varios mecanismos de acción?.

Respecto a esta última pregunta, existe una corriente que propone que aunque es difícil formular un solo mecanismo de acción aplicable a todas las situaciones, es posible que una sola reacción "maestra" fuera responsable de disparar las distintas acciones que producirían las distintas respuestas, dependiendo del estado genético y metabólico de la célula "blanco"(14). Otra corriente sugiere que las distintas respuestas dependen de diversas interacciones primarias del fitorregulador con las células (distintos mecanismos de acción) (14).

Tratando de dar respuesta a las preguntas anteriores y con el fin de conocer el mecanismo de acción de las auxinas, se han seguido distintas aproximaciones experimentales entre las que se

encuentran:

-El aislamiento y caracterización de los receptores de auxinas en los tejidos de respuesta.

-El estudio del efecto de las auxinas en la regulación de la expresión genética en los tejidos de respuesta.

-El estudio de la cinética de las respuestas al fitorregulador.

La rapidez de la respuesta de elongación celular a auxinas ha hecho que la mayoría de los estudios sobre su mecanismo de acción se enfoquen a este efecto, mientras que otras respuestas tales como la división o diferenciación celular han recibido mucha menor atención.

Para explicar las bases moleculares de la elongación celular inducida por auxinas se han propuesto dos hipótesis aparentemente incompatibles, que generaron grandes controversias y que dirigieron la investigación en este campo por un periodo muy prolongado (25,26).

-La hipótesis de la expresión genética, propuesta por Key y colaboradores, sostenía que las auxinas actúan en algún punto de la transcripción y/o traducción regulando la síntesis de polipéptidos necesarios en el proceso del crecimiento (27). Esta hipótesis fue ampliamente aceptada en la década de los 60's ya que se reportaron diversas evidencias que la apoyaban. Entre estas evidencias se encuentran los estudios de elongación celular en que la remoción de la auxina endógena detenía la elongación y la adición de auxina exógena la restituía. Sin embargo, si junto con la auxina exógena se adicionaba un inhibidor de la transcripción o de la traducción, como por ejemplo la actinomicina D o la cicloheximida, la auxina era incapaz de inducir la elongación (28,29). Otras evidencias que

apoyan esta hipótesis son la mayor incorporación de precursores radiactivos en el RNA y las proteínas en tejidos tratados con auxinas (30,31,32,33,34).

En 1969 Evans y Ray reportaron resultados que rebatían la hipótesis de la expresión genética. Estos investigadores presentaron una técnica que les permitía medir minuto a minuto la elongación de coleóptilos en respuesta a las auxinas. Los resultados indicaban un periodo de adaptación de aproximadamente 10-15 minutos antes de que la respuesta fuera medible. Estos autores argumentaban que éste era un periodo sumamente corto para permitir la regulación con base en la expresión genética (26).

Por otra parte, las técnicas disponibles en ese tiempo no permitían detectar cambios en las proteínas o los RNA mensajeros específicos en respuesta a las auxinas, a tiempos que fueran lo suficientemente cortos para inducir la elongación celular. Además, existían múltiples críticas respecto a la interpretación de los resultados de los experimentos con inhibidores de la transcripción y de la traducción. Esto sobre la base de que quedaba la posibilidad de que la inhibición de la elongación inducida por auxinas, causada por estos compuestos, se debiera a otros eventos no relacionados directamente con la acción auxínica.

-Hipótesis del "crecimiento ácido". Esta hipótesis fue propuesta en los inicios de la década de los 70's por Hager y Cleland (26,35), quienes sostenían que la elongación celular en respuesta a las auxinas se iniciaba por la secreción de protones inducida por ellas. Entre las evidencias que apoyan esta hipótesis tenemos: a) la inducción de la elongación celular por auxinas en el tejido "blanco" puede ser sustituida por protones exógenos (36), b) el uso de amortiguadores con pH mayor a 6 en el medio externo

inhibe la elongación celular inducida por auxinas, c) en algunos sistemas (chicharo, maíz, avena), se ha podido demostrar que las auxinas inducen la acidificación del medio extracelular (23,37). Esta hipótesis hizo que los experimentos se enfocaran a estudios del efecto de las auxinas en la membrana y la pared celular. Sin embargo, hasta la fecha no se ha logrado caracterizar una ATPasa de protones regulada por auxinas, ni se conocen exactamente los mecanismos moleculares que hacen que al acidificarse el medio extracelular se induzca la elongación de la célula.

Posteriormente Vanderhoef(25,26) integró ambas hipótesis en una sola que pudiera explicar la cinética bifásica en el crecimiento que a menudo se obtiene. Esta hipótesis sugiere que la elongación celular inducida por las auxinas involucra dos fases: una respuesta rápida que resulta simplemente de la secreción de protones y una fase posterior (necesaria para un crecimiento sostenido) que está mediada por la regulación de la expresión genética.

En los últimos siete años la regulación de la expresión genética por las auxinas ha cobrado nuevo auge, debido sobre todo a la disponibilidad de las nuevas técnicas de biología molecular que han permitido demostrar la participación de las auxinas en este proceso (4,5).

II.2.1 Regulación de la síntesis de proteínas por las auxinas.

La búsqueda de cambios específicos en las proteínas sintetizadas en un tejido en respuesta a las auxinas se ha enfrentado a la carencia de técnicas analíticas sensibles que permitan resolver mezclas complejas de proteínas (4,5). A continuación se revisarán los resultados obtenidos en diversos tejidos.

-Tejidos en elongación.

Entre los primeros intentos por demostrar que las auxinas alteran el patrón de proteínas sintetizadas se encuentra el trabajo de Patterson y Trewavas (33), en secciones etioladas de epicotilos de chícharo. En este trabajo las secciones de epicotilo control se marcaron con [³H]-aminoácidos, en tanto que las secciones tratadas con auxinas se marcaron con [¹⁴C]-aminoácidos. Los productos marcados se extrajeron, se mezclaron, se fraccionaron en una columna de Sephadex G-100 y se determinó la relación ¹⁴C/³H en las fracciones de la columna. A pesar de las limitaciones en la resolución de la técnica, el cambio en la relación ¹⁴C/³H a través de las fracciones de la columna sugirió que las auxinas alteraban el patrón global de síntesis de proteínas en un periodo de 2 horas posteriores a su aplicación a secciones de epicotilos de chícharo.

Bates y Cleland (38) usaron una técnica de doble marcaje similar a la de Patterson y Trewavas para analizar el efecto del tratamiento con auxinas (AIA) en coleoptilos de avena, solo que en este caso las proteínas se resolvieron por electroforesis en geles de poliacrilamida de baja densidad y los geles secos se cortaron en rebanadas. En los resultados no se pudieron detectar diferencias en la relación ¹⁴C/³H. Sin embargo se considera que la resolución alcanzada al separar el gel en rebanadas es muy pobre y pudiera suceder que exista más de un polipéptido por fracción, lo cual enmascara o disminuye la detección de cualquier cambio específico.

Zurfluh y Guilfoyle (2,39) analizaron el efecto de 2,4-D en secciones de hipocotilos de soya en elongación. En sus experimentos se marcan los hipocotilos con [³⁵S]-metionina y separaron los productos marcados por electroenfoque en la primera dimensión y por electroforesis en geles con SDS en la segunda dimensión. Esta

metodología les permitió aumentar la resolución de las proteínas. Los resultados indican que la mayoría de la marca (aproximadamente 70%) se incorpora en las proteínas sintetizadas en los extremos de los hipocotilos (1 mm de las secciones de 1.2 cm), lo cual puede enmascarar los cambios inducidos por auxinas. Si se remueven los extremos antes de analizar las proteínas, se encuentra que las auxinas producen cambios en las proteínas sintetizadas, los más dramáticos se observan en dos polipéptidos de 100 y 40 000 daltones de peso molecular.

Schuster y Davies (3) analizaron los polipéptidos de epicotilos de chícharo tratados y sin tratar con auxinas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción con plata. Los resultados muestran algunos cambios en los patrones de proteínas después de 15 horas de tratamiento.

A pesar del aumento en la resolución que da la electroforesis bidimensional, sigue siendo difícil detectar cambios en las proteínas sintetizadas en respuesta a auxinas, debido a que con el marcaje radiactivo se necesitan dar tratamientos largos (mínimo de una hora) para que se alcance la radiactividad específica suficiente que pueda ser detectada. Por esta razón no se pueden detectar respuestas rápidas (de 10 a 20 minutos de tratamiento con auxinas) que corresponderían a la fase inicial de la elongación. Además al trabajar con tejidos aislados gran parte de la marca se puede incorporar en proteínas que se sintetizan en respuesta a la herida y no a las auxinas, lo cual enmascara los resultados.

-Tejido maduro.

Zurfluh y Guilfoyle (2,39) analizaron también el efecto de auxinas en la síntesis de proteínas de secciones de hipocotilos que no elongan. Los resultados indican cambios más dramáticos y

distintos en estas secciones que en las que elongan. Algunas proteínas se estimulan en tanto que otras se reprimen.

-Explantos de tubérculos.

Melanson y Trewavas (11) estudiaron explantes de alcachofa que requieren de auxinas en el medio de cultivo para la inducción de la síntesis de DNA y la división celular. Al analizar las proteínas marcadas con [³⁵S]-metionina de núcleos encontraron que las auxinas inducen la acumulación de algunas proteínas no histónicas cuatro horas después de su aplicación. A las 15 horas se observan alteraciones en 20 proteínas y de las 18 a las 21 horas se inducen 40 proteínas. Entre las proteínas más prominentes se encuentra una de 110 000 daltones. En el citoplasma casi no se detectaron cambios. Estos resultados sugieren que las alteraciones producidas en las proteínas nucleares pueden estar involucradas en la síntesis de DNA y la división celular.

II.2.2 Regulación de los niveles de RNA mensajeros por auxinas

II.2.2.1 Estudios en sistemas de síntesis de proteínas *in vitro*.

Como ya se indicó anteriormente, existen diversos problemas que impiden hacer experimentos de marcaje *in vivo* para analizar las respuestas rápidas a auxinas (entre 10 y 20 minutos), por lo que se han intentado otras aproximaciones al estudio de las respuestas primarias de las auxinas. Entre éstas se encuentra la traducción *in vitro* de los RNA mensajeros de tejidos tratados con auxinas. La limitante de este sistema es la fidelidad con que se obtengan los productos de traducción *in vitro* comparados con los que se sintetizan *in vivo*. La cantidad de radiactividad incorporada en un producto de traducción *in vitro* muestra generalmente una fuerte correlación con la abundancia de ese RNA mensajero particular (4).

-Secciones de tejidos en elongación.

Los estudios de traducción *in vitro* se han efectuado generalmente con RNA poli-A⁺ y los productos formados se han analizado mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.

En hipocotilos etiolados de soya se encontró que el 2,4-D incrementa en un lapso de 1 a 3 horas de tratamiento los niveles de los RNA mensajeros de 10 productos de traducción (peso molecular de 25 a 35 kdaltones). Al analizar el efecto del AIA se encontró que produce las mismas alteraciones. En tiempos menores de incubación (15 minutos) las auxinas sólo modifican uno de los péptidos mencionados anteriormente (39,40).

En secciones de epicotilos de chícharo Theologis y Ray encontraron que el AIA modifica varios productos de traducción *in vitro* en el rango de 20 a 40 kdaltones; al menos tres de los cuáles se alteran después de 20 minutos de tratamiento. A tiempos mayores de tratamiento aumentan los productos de traducción modificados (41,42)

En secciones de coleoptilos de maíz se han detectado cambios después de 10 minutos de la aplicación de auxinas (43).

En general, los polipéptidos modificados en respuesta a auxinas tienen un peso molecular entre 20 y 40 kdaltones. No se sabe si no se han detectado polipéptidos mayores porque no se modifiquen o porque se traducen con menor eficiencia en un sistema *in vitro*. La cinética de las alteraciones observadas por este método es lo suficientemente rápida para participar en la respuesta primaria, sin embargo, para poder asegurarlo se requieren más evidencias. Por otra parte Theologis y Ray discuten como evidencia en contra de que estas alteraciones participan en la respuesta, el hecho de que la abundancia de los productos modificados es muy baja

(41,42).

-Secciones de tejidos que no elongan.

Zurfluh y Guilfoyle han encontrado que los productos de traducción modificados por la acción de auxinas en secciones que no elongan, difieren a los detectados en secciones en elongación, en tanto que otros son comunes lo cual sugiere un sitio de acción común en ambos sistemas (44).

Debido a que el tratamiento con concentraciones altas de auxinas puede inducir la síntesis de etileno (45,46), se ha sugerido que algunas de las alteraciones podían atribuirse a un efecto secundario de éste. Para determinar si el etileno participaba en la respuesta, Zurfluh y Guilfoyle analizaron los productos de traducción de tejidos tratados con un precursor de etileno, encontrando que efectivamente algunos productos eran los mismos que se inducen por la aplicación de 2,4-D (44). Sin embargo, existen otros productos de traducción que responden específicamente a 2,4-D (40).

También en hipocotilos de soya, Baulcombe *et al* han analizado los productos de traducción inducidos por 2,4-D pero a tiempos más largos, por lo que es difícil definir si alguno de estos cambios corresponde a los encontrados por Zurfluh y Guilfoyle a tiempos cortos (30,47).

En células de cultivo de tejidos de soya y chícharo Bevan y Northcote también han detectado modificaciones en los productos de traducción de RNA mensajeros, de células en las que se eliminaron las auxinas del medio de cultivo y se estudió el efecto de la readición de este fitorregulador. Los péptidos modificados tienen un peso molecular que va de 15 a 65 kdaltones y estos autores los relacionan con la respuesta de división celular observada en estas

células después de 24-36 horas de la readición (48).

II.2.2.2 Clonación de los RNA mensajeros regulados por auxinas.

Otra aproximación al estudio de la regulación de los RNA mensajeros por acción de las auxinas ha sido la obtención de DNA complementarios a los mensajeros regulados usando la tecnología del DNA recombinante (4).

Distintos grupos de investigadores han utilizado esta metodología para caracterizar los RNA mensajeros sensibles a la acción de las auxinas (49-51). Los resultados se resumen en la tabla 1 e indican la existencia de RNA mensajeros inducidos y reprimidos por auxinas a tiempos muy cortos (4,5).

Algunos de estos RNA mensajeros sensibles a auxinas se han traducido *in vitro* y se ha observado que las proteínas producidas corresponden a las reportadas previamente por otras técnicas con pesos moleculares entre 25 y 35 kDa (5).

Entre las características de estos RNA mensajeros se encuentran que los mensajeros inducidos representan del 0.001 al 0.01 % y los reprimidos representan del 0.2 al 1 % del RNA poli-A⁺ total en los tejidos intactos. Los primeros se inducen rápidamente (10 a 30 minutos) incrementándose de 2 a 50 veces, mientras que los últimos disminuyen de 9 a 66 veces después de 4 h de tratamiento (50). La regulación de los niveles de RNA mensajeros por auxinas no puede atribuirse a una respuesta a herida ya que la aplicación de 2,4-D a tejidos intactos produce el mismo efecto (50). Al comparar las clonas de cDNAs descritas por Walker & Key (49) con las descritas por Hagen et al (50) no se encontró homología; sin embargo, no se sabe si son o no homólogas con las descritas por Theologis et al en chícharo (51).

Tabla 1

Características de los RNA mensajeros regulados por auxinas.

| Clona cDNA | Tejido (Ref) | Tamaño del cDNA inserto (Kb) | Tamaño del RNA (nucleótidos) | Fuente del RNA poli-A ⁺ | Nivel de expresión en tejido intacto (% RNA poli-A ⁺ total) | Veces de aumento o disminución con puesta auxinas | Tiempo mínimo de res-puesta |
|------------|----------------------|------------------------------|------------------------------|---|--|---|-----------------------------|
| p 3 | Hipoco- | 0.43 | 1000 | Hipocoti- | 1.0 | 66 ↓ | 4 h |
| p 9 | tilos de | 0.33 | 350 | los de soya | 0.9 | 9 ↓ | " |
| p 11 | soya (47) | 0.42 | 750 | intactos +/- auxina. | 0.2 | 20 ↓ | " |
| pJCW 1 | " | 0.74 | 1100 | Explantos de | 0.01 | 5 ↑ (6 h) | 30 mir |
| pJCW 2 | " (49) | 0.72 | 1000 | hipocotilos de soya +/- auxinas. | <0.01 | 8 ↑ (6 h) | 15 mir |
| pGH 1 | " | 1.20 | 1700 | Hipocotilos | <0.01 | 2 ↑ (4 h) | 30 mir |
| pGH 2 | " | 0.20 | 1000 | de soya in- | <0.01 | 7 ↑ " | 40 " |
| pGH 3 | " | 1.30 | 2400 | tactos +/- | 0.001 | 30 ↑ " | 30 " |
| pGH 4 | " (50) | 0.30 | 1100 | auxinas. | 0.01 | 3 ↑ " | 30 " |
| pIAA4/5 | Epicoti- | 0.70 | 950 | Explantos | 0.01 | 50 ↑ (2 h) | 10-15 |
| pIAA 6 | los de chí- charo | 0.72 | 850 | de epicoti- los de chí- charo +/- auxinas. | 0.01 | 50 ↑ " | min " |

Tomado de Guilfoyle, T (5).

Respecto a la correlación existente entre los niveles de auxina endógena y la regulación de los niveles de los RNA mensajeros no hay resultados concluyentes, ya que mientras que los mensajeros reprimidos por auxinas encontrados por Baulcombe y Key (52) muestran una correlación positiva con los niveles de auxinas (mayor concentración de auxina mayor represión) otros mensajes muestran correlación negativa (49).

La participación de la regulación de los niveles de RNA mensajeros por auxinas en la respuesta primaria a estos fitorreguladores se ha juzgado siguiendo criterios tales como la rapidez de la respuesta, la especificidad de la respuesta, etc.

Los estudios de la cinética de acumulación o disminución de los niveles de los RNA mensajeros regulados por auxinas indican que dicha regulación se observa desde los 10-15 minutos e incluso 5 minutos posteriores al tratamiento (53). Estas respuestas son más rápidas que la inducción por giberelinas de alfa-amilasa en células de aleurona y comparables a las respuestas más rápidas de inducción de RNA mensajeros en animales (54,55,56).

Los resultados de regulación en los niveles de RNA mensajeros por auxinas pueden deberse a una regulación transcripcional, a regulación en el procesamiento post-transcripcional o bien a una estabilización y/o degradación selectivas de algunos RNA mensajeros. Para poder discernir entre estas opciones es necesario desarrollar un sistema de transcripción *in vitro* de genes vegetales (5).

Respecto a la especificidad de la respuesta, ésta ha sido claramente demostrada en los sistemas de epicotilos de chícharo y de hipocotilos de soya (51,53,57). La incubación de estos tejidos con auxinas sintéticas induce la misma respuesta que la auxina

natural AIA, en tanto que la aplicación de análogos inactivos no produce ninguna respuesta.

La identificación de los polipéptidos codificados por los RNA mensajeros regulados por auxinas es de gran importancia para comprender el mecanismo de acción de estos fitorreguladores. Sin embargo, no hay un método directo que relacione los productos de traducción *in vitro* o sus RNA mensajeros con la naturaleza y función de esos polipéptidos, por lo que se requieren aproximaciones indirectas a este problema como son: secuenciar los RNA mensajeros regulados por auxinas y sus productos de traducción y comparar estas secuencias con las de otras proteínas que se encuentran en bancos de datos, encontrar la localización subcelular de los polipéptidos con el uso de anticuerpos marcados, etc. (5).

Respecto a los RNA mensajeros regulados por auxinas a tiempos cortos (aproximadamente 10 minutos), se considera que participan en la respuesta de elongación (una respuesta rápida) y aún no se ha logrado identificar ninguno de sus productos de traducción (5). En cuanto a los RNA mensajeros regulados por auxinas a tiempos mayores, los cuáles se considera que participan en respuestas más lentas como son la división y diferenciación celular, se ha logrado identificar a algunos de los polipéptidos para los que codifican. Verma *et al* (58) han reportado que las auxinas regulan los niveles del RNA mensajero de la celulasa después de 12 horas de tratamiento; sin embargo, el aumento en la actividad de celulasa se detecta hasta las veinticuatro horas de tratamiento. Este desfase sugiere que además de la regulación en los niveles del mensaje (regulación transcripcional), debe existir otro control post-transcripcional o traduccional en esta proteína. Los grupos de Guilfoyle y de Miassod (59,60,61) han reportado la regulación por

auxinas de las RNA polimerasas I y II y sugieren que dicha regulación es a nivel transcripcional. Por otra parte Gantt y Key (62,63) han encontrado que las auxinas regulan de manera coordinada los niveles de los RNA mensajeros de diversas proteínas ribosomales (S16,S32,L6,L7,L13,etc.).

Los resultados anteriores no desechan la acción de auxinas a nivel de la RNA polimerasa, que pudiera transcribir preferencialmente ciertas zonas del DNA.

-Perspectivas de estudio.

Los resultados recientes de la regulación de los niveles de RNA mensajeros por auxinas han abierto nuevas perspectivas para la comprensión del mecanismo de acción de estos compuestos. Entre las investigaciones a realizar se pueden mencionar: a) identificar los RNA mensajeros regulados por auxinas, así como los productos que codifican, b) encontrar la localización subcelular de los polipéptidos codificados, c) caracterizar los genes de los RNA mensajeros regulados, d) determinar si los genes regulados por auxinas en distintos tejidos son homólogos entre sí o no, e) determinar el tiempo de vida media de los RNA mensajeros regulados por auxinas, f) desarrollar un sistema de transcripción *in vitro*, etc. (4,5).

II.2.3.Receptores de auxinas.

Se ha propuesto que las auxinas al igual que otros fitorreguladores, ejercen su acción fisiológica mediante la interacción con receptores específicos, los cuales al ser activados por el fitorregulador desencadenan una serie de eventos que llevan a la respuesta observada (64).

Las principales aproximaciones metodológicas en el estudio de receptores auxínicos provienen de campos afines, tales como los de receptores de hormonas animales, neurotransmisores, etc. Dichos estudios incluyen experimentos de unión *in vitro* y requieren que el posible receptor se una a la auxina (ligando), con una especificidad, velocidad y afinidad congruentes con las características de la dosis-respuesta de dicha auxina (64,65,66).

A continuación se describen algunos de los principales resultados en el campo de los receptores de auxinas, para ello se hará una división de los sitios de unión de auxinas encontrados (posibles receptores), de acuerdo a su localización celular en: membranales y no membranales.

-Sitios de unión membranales.

Venis y Batt (67) han encontrado que las membranas de coleóptilos de maíz poseen dos sitios de unión a la auxina ácido naftalén acético. Uno de ellos denominado sitio I presentó una K_D de 1.5×10^{-7} M con 24 pmoles/g de tejido de sitios de unión, en tanto que el sitio II presentó una K_D de 16.1×10^{-7} M con 110 pmoles/g de tejido. El sitio II a pesar de tener menor afinidad por la auxina tiene mayor especificidad. El sitio II se ha localizado en plasmalema o aparato de Golgi, en tanto que el sitio I se localiza en una fracción más ligera.

En estudios posteriores del grupo de Venis (68,69,70) sobre los sitios I y II, encontró pesos moleculares de 50 000 y 54 000 junto con bandas de 25 000 y 27 000 daltones (por lo que se sugiere la existencia de dímeros).

El grupo de Hertel *et al* reportó (7) que las membranas de coleóptilos de maíz poseen un solo tipo de sitios de unión, con una

K_D del orden de 5 a 7×10^{-7} M.

Por otra parte Ray ha localizado el sitio de unión a ácido naftalén acético principalmente en el retículo endoplásmico de membranas de coleoptilos de maiz.

La existencia de múltiples sitios de unión en las células que responden a auxinas se ha explicado como la movilidad que presentan estos sitios en la célula.

La relevancia fisiológica de estos sitios de unión se ha probado mediante la comparación de la especificidad de unión a una serie de análogos y la respuesta fisiológica de los mismos (7). La especificidad se incrementó en presencia de un factor del citosol denominado "factor del sobrenadante", el cual se caracterizó e identificó posteriormente como una mezcla de benzoxazolinonas metiladas (71).

Morreé y Cherry han aportado evidencias de la localización de los sitios de unión a auxinas en la membrana plasmática de hipocotilos de soya (72).

Posteriormente Dohrman, Hertel y Kowalik (73) han comprobado que el principal sitio de unión a ácido naftalén acético (ANA) se localiza en el retículo endoplásmico (sitio I), aunque también distinguieron un segundo sitio de unión (sitio II) en el tonoplasto.

Jacobs y Hertel han localizado un tercer sitio de unión a auxinas en maiz el cual se encuentra en la membrana plasmática (74).

Cross y colaboradores (75) han aislado de la fracción membranal de maiz una proteína con las características del sitio I, ésta proteína está constituida por una sola subunidad y tiene un peso molecular de aproximadamente 80 000 daltones. La K_D de esta

proteína para ANA fue de 4.6×10^{-8} M con 30 pmoles de sitios de unión /g de peso fresco.

El grupo de Libbenga y colaboradores (76,77,78) ha logrado aislar de callos de tabaco un receptor unido a membranas y otro soluble, éste último tiene una $K_D = 1 \times 10^{-8}$ M para AIA, en tanto que el membranal dió una $K_D = 3.5 \times 10^{-6}$ M para ANA.

Trewavas (79) ha encontrado un sitio de unión a auxinas en alcachofa que posee la característica de ser inducible por estos fitorreguladores.

Recientemente Walton & Ray (80) han tratado de correlacionar los cambios en la sensibilidad a auxinas, observados durante el desarrollo o en respuesta a cambios en el medio ambiente, con cambios en la concentración de los sitios de unión. Estos autores han encontrado una correlación entre la disminución de los sitios de unión a auxina en retículo endoplásmico y la disminución en la elongación de segmentos de mesocotilos de plántulas etioladas de maíz al ser iluminadas con luz roja.

Por otra parte Narayanan y Poovaiah (81,82) han detectado sitios de unión membranales a auxinas en fresa y pepino, encontrando una $K_D = 1-2 \times 10^{-6}$ M para ANA, asimismo encontraron que la unión del receptor a esta auxina presenta cooperatividad positiva a bajas concentraciones de la auxina (1×10^{-8} - 5×10^{-7} M).

-Sitios de unión no membranales.

Los sitios de unión de este tipo son aquellos que no están unidos firmemente a membranas, consecuentemente se encontrarán en el sobrenadante después de centrifugar a altas velocidades.

Matthysse y Phillips observaron (83) que las auxinas interactúan con la cromatina induciendo la síntesis de RNA en

presencia de un factor aislado del nucleoplasma de tejidos tratados con auxinas.

Posteriormente Mondal et al (84) reportaron la existencia de una proteína aceptora de AIA en núcleos de endospermo de coco. El complejo auxina-proteína indujo la síntesis de RNA *in vitro*.

En 1971 Venis (85) aisló mediante cromatografía de afinidad una fracción proteica del citoplasma de chícharo y maíz que activa la síntesis de RNA en un sistema heterólogo.

El grupo de Libbenga y colaboradores (77,78) ha reportado la presencia de un receptor soluble a auxinas en explantes y cultivos de tabaco. El peso molecular es de aproximadamente 200 000 daltones y la K_p para AIA es de 1×10^{-9} M; sin embargo, al fosforilarse esta proteína cambia sus características de afinidad a auxinas. Al parecer esta proteína se fosforila *in vivo* y participa en la estimulación de la transcripción en presencia de auxinas (86).

II.3 Segundos mensajeros en plantas.

Todos los organismos vivientes requieren de mecanismos de regulación para funcionar con orden y eficiencia. Esta capacidad para coordinar diversas actividades se basa en un elaborado sistema de comunicación que permite la supervivencia del organismo en un medio ambiente dinámico.

En animales se han estudiado ampliamente las bases bioquímicas de los sistemas de traducción de señales extracelulares y se han identificado varios mensajeros intracelulares (segundos mensajeros) como el AMP cíclico, Ca^{2+} , inositol trifosfato, etc.

Por analogía se han hecho diversos estudios para investigar la existencia de estos segundos mensajeros en plantas. A continuación se dan los resultados obtenidos en este campo.

II.3.1 AMP cíclico en plantas.

La existencia de AMP cíclico en tejidos de plantas superiores se publicó desde hace aproximadamente quince años. Sin embargo, estos primeros reportes no tuvieron una amplia aceptación y han sido criticados debido a que se basaban en evidencias indirectas derivadas de los efectos fisiológicos que ocasionaba la adición de AMP cíclico exógeno o bien en identificaciones cromatográficas dudosas (87). Así Pollard (88) ha demostrado que al agregar [¹⁴C]-adenina a semillas de cebada en germinación se obtenía un posible AMP cíclico marcado, que resultó inseparable del AMP cíclico comercial en diez sistemas cromatográficos. Este posible AMP cíclico producía al hidrolizarse una mezcla de isómeros 2' y 5' del AMP. Salomon y Mascarenhas (89,90) han efectuado experimentos similares en tejido de coleoptilo de avena. La asignación del AMP cíclico mediante sistemas cromatográficos y electroforéticos ha sido criticada debido a que dichas técnicas no permiten distinguir entre isómeros tales como el 2'-3' AMP cíclico y el 3'-5' AMP cíclico.

La identificación de AMP cíclico por métodos enzimáticos ha sido también criticada, ya que la especificidad hacia el sustrato de las enzimas usadas no siempre es absoluta.

Brown y Newton (91) han reportado la aplicación de otro procedimiento para identificar AMP cíclico en tejidos de frijol. Dicho procedimiento involucra la combinación de técnicas cromatográficas y electroforéticas y es capaz de separar todos los nucleótidos conocidos de adenina, incluyendo los isómeros 2'-3' y 3'-5' del AMP cíclico.

Posteriormente se ha logrado confirmar la identificación de

AMP cíclico en plantas aplicando la técnica de espectrometría de masas (92).

II.3.1.2. Enzimas del metabolismo del AMP cíclico.

-Fosfodiesterasa de AMP-cíclico.

Aún antes de que aparecieran los primeros reportes de la existencia de AMP cíclico en plantas, se publicó un trabajo en el que se describía la presencia de actividad de fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos en plantas. Entre las plantas analizadas se encuentran chícharo, papa, frijol, soya, alcachofa, cebada, zanahoria y tabaco (87).

-Adenilato ciclasa.

La existencia de adenilato ciclasa en tejidos de plantas superiores fue reportada inicialmente en 1970 (88). Esta actividad se dedujo por la incorporación de adenina marcada con ^{14}C en una fracción que co-cromatografiaba con AMP cíclico exógeno en células de aleurona de cebada. Pronto se reportaron demostraciones similares en otros tejidos y otras plantas, localizándose la enzima en membrana plasmática y retículo endoplásmico (87).

II.3.1.3. Proteínas reguladas por AMP cíclico.

A pesar de la intensa búsqueda de proteínas vegetales reguladas por AMP cíclico, los resultados han sido infructuosos. Aunque se han reportado cinasas en plantas superiores, hasta la fecha no se han descubierto cinasas dependientes de AMP cíclico (87). Tampoco hay resultados concluyentes que demuestren regulación en los niveles de AMP cíclico en respuesta a estímulos extracelulares. Al respecto Janistyn encontró que el AIA incrementa la síntesis de AMP cíclico en 110 -140 % (87). Por otra parte Giannattasio *et al* encontraron en tubérculos de alcachofa que la

actividad de la adenilato ciclasa se incrementa en 300 % en presencia de ácido giberélico (93). Sin embargo, no hay otros reportes que confirmen estos resultados y estudien cambios en los niveles de AMP cíclico en respuesta a otros estímulos lo que ha llevado a pensar que deben existir otras moléculas que funcionen como segundos mensajeros en plantas.

II.3.2. Calcio-Calmodulina en plantas.

La importancia del calcio en el crecimiento y desarrollo vegetal se ha conocido durante muchos años; sin embargo, sólo recientemente se han acumulado evidencias que sugieren que el calcio actúa como un segundo mensajero en la transducción de señales extracelulares en plantas (10).

Existen reportes que indican que varios procesos fisiológicos y diversas actividades enzimáticas se encuentran bajo el control del calcio. Más aun, algunas respuestas fisiológicas a estímulos como la luz, la gravedad o los fitorreguladores pueden ser inducidas manipulando los niveles celulares de calcio (94,95).

Para que el calcio funcione como mensajero intracelular es requisito que la concentración de calcio libre en el citoplasma esté regulado, con un nivel basal bajo que se incremente en respuesta a los estímulos. Además se requiere que exista un mecanismo para detectar los cambios en la concentración de calcio y traducirlos en una respuesta fisiológica. Al respecto se sabe que el calcio puede actuar directamente o a través de la calmodulina.

II.3.2.1. Existencia y localización de calmodulina en plantas.

En 1978 Anderson y Cormier (96) reportaron las primeras evidencias de la presencia de calmodulina en plantas. A partir de esta fecha se ha detectado calmodulina en las distintas plantas

estudiadas (97,98,99). La calmodulina se ha localizado en distintos compartimientos subcelulares como el citoplasma, la mitocondria, el cloroplasto, el núcleo, membranas, etc.. La calmodulina de vegetales ha mostrado propiedades biológicas y fisicoquímicas similares a las de otros organismos (100,101,102,103).

II.3.2.2.Regulación de los niveles intracelulares de calcio en plantas.

En animales se ha medido la concentración de calcio libre en el citoplasma y se ha encontrado que es de 1×10^{-7} M, varios órdenes de magnitud menor a la concentración de calcio total que es de un rango milimolar. El resto de los iones Ca^{2+} se encuentra compartimentalizado en mitocondria, retículo endoplásmico, etc o bien asociado a la membrana plasmática y proteínas (104).

En algas se ha determinado la concentración de calcio libre en el citoplasma y se encontró que era de alrededor de 1×10^{-7} M y se incrementaba en respuesta a un estímulo eléctrico (104). Recientemente el grupo de Trewavas ha logrado determinar los niveles intracelulares de calcio en protoplastos de plantas superiores, encontrando que normalmente están en el rango de 1.7×10^{-7} M (105). Existen evidencias de que la concentración de Ca^{2+} libre en el citoplasma es resultado de su acumulación en la mitocondria y de su expulsión activa a través de la membrana plasmática (106). Gross y Marmé han demostrado la existencia de una ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+}) que transporta calcio en una fracción microsomal enriquecida en membrana plasmática de maiz y avena (106,107). Posteriormente este mismo grupo de trabajo demostró que este mecanismo de transporte está regulado por el complejo Ca^{2+} -calmodulina (108). Este sistema saca iones calcio de la

célula. El sistema de transporte de calcio mitocondrial está regulado por fitocromo. La luz roja disminuye la incorporación de calcio a la mitocondria aumentando su concentración citoplásmica, en tanto que la luz roja lejana restaura la velocidad de incorporación a los niveles encontrados en la oscuridad (109). Si se analizan las actividades de transporte de calcio en función de las concentraciones citoplásmicas de calcio se puede observar que el sistema de transporte microsomal funciona a concentraciones menores de calcio mientras que el transporte mitocondrial actúa a concentraciones mayores de este ión (110). Además se ha encontrado que el sistema de transporte microsomal es capaz de responder a distintos estímulos externos, como sería de esperarse para que el calcio funcione como modulador (111). La calmodulina activa este transporte, la luz roja lejana lo inhibe, la auxina natural lo estimula, una citocinina natural lo inhibe en algunos casos y en otros lo estimula (110). De los resultados anteriores es interesante hacer notar que los mismos iones calcio regulan la actividad de su transporte en la membrana plasmática asegurando que el incremento en su concentración y por consiguiente los efectos que produce sean transitorios.

II.3.2.3. Procesos y enzimas dependientes de Ca^{2+} -calmodulina en plantas.

Además del control que ejerce el complejo Ca^{2+} -calmodulina en el transporte de Ca^{2+} se han descubierto otras enzimas que son reguladas por este mecanismo.

En 1965 se reportaron cambios en la concentración de NADP inducidos por la luz. El aumento en NADP correspondía a una disminución del NAD y la enzima encargada de efectuar esta

transformación es la NAD cinasa. Inicialmente se pensó que la luz se requería para la síntesis de ATP, sin embargo, la adición de ATP exógeno a la mezcla de reacción en la oscuridad no aumentó la formación de NADP (110). Posteriormente se encontró que el control de la luz en la actividad de la NAD cinasa esta mediado por la regulación que ejerce la luz en los niveles de Ca^{2+} intracelular. En 1977 se encontró que la NAD cinasa de chícharo poseía un activador que posteriormente fue identificado como calmodulina (113). En 1983 Muto efectuó estudios cinéticos de la NAD cinasa y encontró que tiene un pH óptimo de alrededor de 8, la concentración de Ca^{2+} requerida para alcanzar la mitad de la saturación es de 70 μM . Estos parámetros caen dentro de los fisiológicos ya que se sabe que los cloroplastos (principal sitio de localización de la enzima) incorporan Ca^{2+} y que el estroma en iluminación se alcaliniza.

Otro sistema que se sabe que está regulado por Ca^{2+} -calmodulina es el de la quinato NAD-oxidoreductasa, que transforma el quinato en dehidroquinato. Se cree que esta enzima participa en una vía conectada con la del ácido shiquímico. Inicialmente se encontró que esta enzima se regula por fosforilación-desfosforilación y posteriormente se demostró que la fosforilación se llevaba a cabo por una cinasa dependiente de Ca^{2+} -calmodulina (113,114).

Existen varios reportes respecto al papel del sistema Ca^{2+} -calmodulina en la acción de los fitorreguladores. Obata *et al* (115) han estudiado el efecto de antagonistas de la calmodulina en la secreción de α -amilasa inducida por ácido giberélico, encontrándose que estos antagonistas inhiben la respuesta. Por su parte Elliot ha estudiado la influencia de varios antagonistas en

dos respuestas a citocininas: la síntesis de betacianina y el cultivo de callos de soya. Los resultados indican que los antagonistas inhiben las respuestas reguladas por citocininas (116). En estudios similares se encontró también que estos antagonistas inhiben la respuesta de elongación de coleoptilos de trigo inducida por auxinas y la síntesis de α -amilasa inducida por ácido giberélico (117). Oláh *et. al* (118) han encontrado que la citocinina bencilaminopurina induce el acoplamiento entre la ATPasa de Ca^{2+} y la calmodulina en raíces de trigo.

Actualmente se cree que el principal mecanismo por el que el sistema Ca^{2+} -calmodulina regula procesos bioquímicos intracelulares, en respuesta a estímulos externos, es la fosforilación de proteínas por cinasas dependientes de dicho sistema (10). En la sección II.4 se revisarán los conocimientos que se tienen al respecto.

II.3.3. Inositol trifosfato.

En años recientes se estableció en células animales que el recambio de fosfolípidos de inositol participa en la transducción de señales extracelulares. Las hormonas, los neurotransmisores y otros estímulos inducen la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato que da por resultado la producción de diacilglicerol (DAG) y de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), que participan en la transducción de señales (119).

Diversas investigaciones han indicado que el IP_3 actúa como segundo mensajero mobilizando calcio del retículo endoplásmico y el DAG activa a la proteína cinasa C. El aumento en el calcio citoplásmico inducido por IP_3 puede entonces activar enzimas y cinasas dependientes de Ca^{2+} y de Ca^{2+} -calmodulina (10).

II.3.3.1. Recambio de fosfolípidos de inositol en plantas.

Los fisiólogos vegetales han investigado la existencia de mecanismos similares en la transducción de señales en plantas. Al respecto se han encontrado muchos de los componentes del sistema de recambio de fosfolípidos de inositol. Se ha demostrado la existencia de polifosfoinosítidos en células vegetales en cultivo (PIP y PIP₂) (120). Por otra parte Heim y Wagner (121) han encontrado que los niveles de PIP₂ varían durante el ciclo de crecimiento de células vegetales en cultivo por lo que sugieren que el recambio de PIP₂ puede jugar un papel en la regulación de la proliferación celular. También hay evidencias de la presencia de fosfolipasa C (la enzima que hidroliza PIP₂ a IP₃ y DAG), de fosfoinosítido cinasa (que forma PIP y PIP₂) y de proteína cinasa C en plantas (10,122,123). Además se ha observado que la auxina 2,4-D aumenta la degradación de IP₃, mientras que su análogo inactivo 2,3-D no tiene ningún efecto (10). Otro estímulo externo que se ha comprobado que incrementa el recambio de fosfolípidos de inositol en plantas es la luz (124).

II.3.3.2. Regulación de los niveles intracelulares de Ca²⁺ por IP₃ en plantas.

Anteriormente (sección II.3.2.) se mencionó que las auxinas inducen la liberación de Ca²⁺ de membranas microsomales vegetales. En estudios recientes se ha demostrado que el IP₃ induce la liberación de calcio microsomal en plantas (125,126).

II.4. Fosforilación de proteínas en plantas.

La fosforilación-desfosforilación de proteínas es reconocido como un mecanismo regulatorio importante por el cual se alteran las actividades de enzimas regulatorias clave y moléculas receptoras

dentro de la célula en respuesta a un gran número de estímulos externos (9).

En los últimos años se ha reportado la existencia de cinasas en diferentes fuentes vegetales estudiadas, con diferente localización subcelular. Así por ejemplo, hay reportes de cinasas en soya, germen de trigo, chícharo, maíz, etc., localizándose en citoplasma, núcleo, membranas, cloroplasto, mitocondria, etc. (127, 128, 129, 130, 131).

Hasta la fecha los únicos compuestos efectores reportados que regulan la actividad de las proteínas cinasas vegetales son Ca^{2+} y Ca^{2+} -calmodulina, luz, fosfolípidos y poliaminas (10, 123, 130, 131, 132, 133, 134, 135).

A pesar de que existen reportes de proteínas fosfatasa vegetales no hay evidencias de que sean o no dependientes de Ca^{2+} (10).

Entre las proteínas fosforiladas en plantas se han reportado algunas proteínas ribosomales (136, 137, 138), factores de iniciación (136), proteínas nucleares (histonas y no histonas) (139, 11), proteínas membranales (133, 135), proteínas de cloroplastos y de mitocondrias (10), etc.. Asimismo se ha reportado que las actividades de algunas enzimas vegetales tales como la quinato:NAD⁺ oxidoreductasa (113, 114), la piruvato deshidrogenasa, la fosfoenolpiruvato carboxilasa (10) y el fitocromo (140) se regulan por fosforilación-desfosforilación.

Recientemente se han acumulado evidencias de que la acción de los fitorreguladores está asociada con cambios en el estado de la fosforilación de las proteínas (10). Así el grupo de Poovaiah *et al* han reportado cambios en la fosforilación de proteínas inducidas

por auxinas en coleoptilos de avena (134) y en epicotilos de chícharo (10). En chícharo las auxinas inducen una disminución en la fosforilación de ciertos polipéptidos específicos y un incremento en la fosforilación de otro grupo de polipéptidos. Más aún, en presencia de inhibidores de calmodulina la fosforilación de esos péptidos se ve afectada por lo que se sugiere que en los efectos de auxinas participan proteínas cinasas dependientes de calmodulina. Debido a que también existen reportes previos de que las auxinas inducen el eflujo de calcio (141) se propone que las auxinas cambian los niveles de calcio en el citosol, alterando así las actividades de proteínas cinasas y/o fosfatasa y resultando en la modificación del estado de fosforilación observado en proteínas específicas (10).

Por otra parte se ha encontrado que algunas de las proteínas ribosomales cambian su estado de fosforilación en respuesta a estímulos extracelulares tales como el shock de calor y la adición de fitorreguladores exógenos (citocininas y ácido abscísico) (137, 138).

III. MATERIALES Y METODOS

III.1 Materiales.

III.1.1 Reactivos.

Todos los reactivos utilizados fueron de grado reactivo analítico de las compañías: Técnica Química, Merck, Sigma y Pharmacia.

III.1.2 Equipo.

Campana de flujo laminar Clean Beach Hitachi, potenciómetro Methrom Ltd modelo E 300, autoclave Wisconsin steroclave 25X, placas de calentamiento y agitación Corning PC351, vortex Genie modelo K 50-G, centrifuga Beckman J2-21, ultracentrifuga Internacional IEC, microfuga Beckman modelo B, cámara de crecimiento de temperatura controlada Griffin, estufa de vacío Precisión, equipo para electroforesis en tubo ISCO modelo 150 A, equipo para electroforesis en placa ISCO modelo 220, fuente de poder ISCO modelo 490, espectrofotómetro Pye UNICAM SP6-550 UV/VIS, balanza analítica Mettler H6, balanza Chyo JP-3000 W, liofilizadora Labconco 3, ultracongelador Bio Freezer Forma Scientific.

III.1.3 Material biológico.

En el presente trabajo se usaron semillas de maíz (*Zea mays* L.) variedad Chalqueño cosecha 1986, compradas a Productora Nacional de Semillas México (PRONASE).

III.2 Métodos.

III.2.1 Preparación del material biológico.

En el presente trabajo se usaron ejes embrionarios disectados manualmente de las semillas de maíz y desinfectados o esterilizados en la superficie como se indica a continuación.

Los ejes embrionarios seccionados se colocan en una caja de

Petri estéril, se cubren con etanol al 70 % y se agitan durante 15 segundos. Se elimina el etanol y se enjuagan con agua desionizada estéril varias veces. Se cubren con una solución de hipoclorito de calcio al 5 % y se agitan durante 10 minutos. Se elimina la solución de hipoclorito de calcio y se enjuagan con agua desionizada estéril varias veces, se escurren y se colocan en el medio de incubación correspondiente. Todos los pasos anteriores se efectúan en la campana de flujo laminar.

III.2.2 Preparación de los medios de incubación.

En la incubación de los ejes embrionarios de maíz se usaron las sales del medio de Murashige y Skoog (142) (Tabla 1), adicionada de los reactivos indicados en la Tabla 2.

Para la preparación del medio es importante añadir las soluciones en el orden indicado en la tabla 1 en aproximadamente 300 ml de agua desionizada y con agitación constante para evitar la precipitación de sales. El medio control está compuesto por los reactivos indicados anteriormente. En el caso del medio con auxinas (AIA ó MCPP, 5 mg/l de medio), éstas se disuelven por separado con un poco de KOH y se adicionan al medio al final junto con la sacarosa (30 g/l de medio, concentración final 87.6 mM), previo ajuste del pH a 5.8 (para evitar que precipite el Fe). Finalmente se ajusta el pH del medio a 5.8 y se afora a un litro. El agar (9 g/l de medio) se lava varias veces por decantación, para eliminar impurezas, hasta que el agua de lavado es incolora. El agar decantado se adiciona al medio y éste se coloca en una parrilla con calentamiento hasta que se funde. Se colocan 5 ml del medio fundido en cada frasco gerber. los frascos se tapan con papel aluminio y se esterilizan en autoclave a 15 lb de presión durante 15 minutos.

Tabla 1. Composición del medio de Murashige y Skoog (MS).

| Solución concentrada | Concentración (g/l) | Volumen de la solución concentrada/l de medio. (ml/l) | Concentración final (M) |
|---|---------------------|---|-------------------------|
| A: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 44.0000 | 10 | 2.993×10^{-3} |
| B: NH_4NO_3 | 16.5000 | 100 | 2.061×10^{-2} |
| KNO_3 | 19.0000 | | 1.879×10^{-2} |
| C: KI | 0.0830 | 10 | 5.000×10^{-6} |
| CoCl_2 | 0.0025 | | 1.051×10^{-7} |
| D: KH_2PO_4 | 17.0000 | 10 | 1.250×10^{-3} |
| H_3BO_3 | 0.6200 | | 1.003×10^{-4} |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.0250 | | 1.033×10^{-6} |
| E: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 37.0000 | 10 | 1.501×10^{-3} |
| $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 1.7000 | | 7.623×10^{-5} |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.0025 | | 1.001×10^{-7} |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.8600 | | 2.991×10^{-5} |
| F: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 5.5700 | 5 | 1.002×10^{-4} |
| Na_2EDTA | 7.4500 | | 1.108×10^{-4} |

Tabla 2. Reactivos adicionados al medio de Murashige y Skoog

| Solución concentrada | Concentración (g/l) | Volumen de la solución concentrada/l de medio (ml/l) | Concentración final (mM) |
|--------------------------|---------------------|--|--------------------------|
| G: glicina | 0.200 | 10 | 0.0260 |
| mio-inositol | 10.000 | | 0.5500 |
| Ácido nicotínico. | 0.050 | | 0.0400 |
| clorhidrato de piridoxal | 0.100 | | 0.0024 |
| clorhidrato de tiamina | 0.100 | | 0.0030 |

III.2.3 Incubación de los ejes embrionarios de maiz.

Los ejes embrionarios de maiz se colocan en el medio correspondiente (control o con auxinas) y se incuban en la cámara de crecimiento de temperatura controlada a 25°C en la oscuridad durante 24 horas.

III.2.4 Obtención de las proteínas del sobrenadante posribosomal.

En la obtención de las proteínas del sobrenadante posribosomal se siguió la técnica descrita por Sánchez de Jiménez y Aguilar (143). Los ejes embrionarios de maiz (aproximadamente 300 mg) se incuban en medio MS con o sin MCPP (5 mg l⁻¹) durante 24 horas a 25°C en oscuridad. En las últimas tres horas (21 a 24) se les añadió un pulso de (³²P)-ortofosfato (37 MBq ml⁻¹, Amersham International). Transcurrido el periodo de incubación los ejes embrionarios se lavan con 20 ml del buffer de molienda (Tris-HCl 50 mM, pH=7.6, KCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, β-mercaptoetanol 5 mM, PMSF 1 mM) con el fin de eliminar la radiactividad no incorporada. Posteriormente los ejes se congelan con nitrógeno líquido, se pulverizan y se homogeneizan con 3 ml del buffer anterior. El extracto se filtra a través de cuatro capas de gasa y se centrifuga a 15 000 g durante 30 minutos. El sobrenadante anterior se centrifuga nuevamente a 200 000 g durante 2 horas y el sobrenadante obtenido es el sobrenadante posribosomal.

III.2.5 Separación de las proteínas fosforiladas en el sobrenadante posribosomal mediante cromatografía de filtración en gel.

Se prepara una columna de 0.9 x 25 cm de Sephadex G-100 equilibrada con el buffer (Tris-HCl 50 mM pH=7.6, KCl 50 mM, MgCl₂

10 mM, β -mercaptoetanol 5 mM, PMSF 1 mM). Posteriormente se aplican a la columna alrededor de 20 mg (30 000 cpm) de las proteínas del sobrenadante posribosomal. Las proteínas se eluyen de la columna con 30 ml del buffer a 4°C y se colectan en fracciones de 1 ml.

III.2.6 Obtención del lisado de reticulocito de conejo.

En la preparación del lisado de reticulocito de conejo se siguió la técnica descrita por Jackson y Hunt (144). Se trabajó con un conejo Nueva Zelanda hembra de tres meses de edad y 3.5 kg de peso. El conejo se sometió a un esquema para hacerlo anémico, como se indica a continuación. El día 1 del esquema se hizo una inyección subcutánea al conejo con 3.5 ml de una solución acuosa de fenilhidracina al 1.25 % (p/v). El día 2 del esquema se repitió la misma dosis y el día 3 se aplicaron 2.5 ml. El día 8 del esquema se sangra al conejo por punción cardíaca, obteniéndose aproximadamente 50 ml de sangre que se recibe en una solución acuosa de EDTA al 10% (p/v) (0.1 ml de solución/5 ml de sangre), en hielo. Los pasos posteriores se efectúan a 2-4°C. La sangre se filtra a través de cuatro capas de gasa para eliminar residuos. Las células se colectan por centrifugación en tubos de policarbonato a 2 000 g por 10 minutos. El sobrenadante se desecha por aspiración con una pipeta Pasteur. Las células se resuspenden en 40 ml de solución salina amortiguada recién preparada (NaCl 0.134 M, KCl 5 mM, MgCl₂ 7.5 mM, D-glucosa 5 mM, HEPES 10 mM pH=7.2) y se centrifugan en las condiciones anteriores. Los lavados se repiten tres veces más y en el último lavado se añade un volumen conocido de solución salina y se mide el volumen celular por diferencia con el volumen total. En la última centrifugación se remueve al máximo la solución salina y se añaden 1.5 volúmenes (con respecto al volumen celular) de agua

desionizada fría. Las células se mezclan perfectamente y el lisado se centrifuga a 15 000 g por 20 minutos. El lisado centrifugado se filtra a través de una malla de nylon de 60 μm para eliminar cualquier agregado residual que contenga. En este punto el lisado se reparte en varias alícuotas de 1 ml, se congela en nitrógeno líquido (con el fin de que el congelamiento sea lo más rápido posible) y se almacena en un ultracongelador a -60°C -70°C .

III.2.7 Complementación del lisado de reticulocito de conejo.

Reactivos.

-Creatina-cinasa. Se prepara una solución concentrada de 5 mg/ml en agua:glicerol 50 % v/v y se almacena en alícuotas a 20°C .

-Creatina-fosfato. Se prepara una solución acuosa 0.2 M y se almacena en alícuotas a 20°C .

-Solución KM. Esta solución contiene KCl 2 M, MgCl_2 10 mM y se almacena en alícuotas a 70°C .

-Mezcla de aminoácidos "fríos". La solución contiene ditiotretitol 1 mM, L-leucina y L-valina 3 mM y 2 mM del resto de los aminoácidos, excepto el aminoácido que se usa como marca (fenilalanina en este caso). La solución se disuelve calentando ligeramente en una parrilla con agitación, se neutraliza con KOH a $\text{pH}=7.2$ y se almacena en alícuotas a 20°C .

-Hemina. Esta solución contiene hemina 1 mM en etilén glicol 85 % v/v. Para preparar 10 ml de la solución se pesan 6.5 mg de hemina, se disuelve en 0.5 ml de NaOH 1 N; se adicionan 0.5 ml de Tris-HCl 1 M $\text{pH}=7.5$ seguidos de 8.5 ml de etilén glicol. El pH se ajusta a 8 con HCl 1 N y se almacena en alícuotas a -70°C .

-ATP. Esta solución contiene ATP 50 mM.

Método.

En el procedimiento que se indica a continuación se usaron tubos Eppendorf y puntas para micropipetas estériles y las adiciones se hicieron en un baño de hielo a 4°C.

Por cada ml de lisado se adicionan 20 µl de hemina (concentración final en el lisado 0.016 mM), 10 µl de creatina cinasa (concentración final en el lisado 40 µg/ml), 66 µl de KM (concentración final en el lisado KCl 105 mM, MgCl₂ 0.527 mM), 66 µl de creatina fosfato (concentración final en el lisado 10.5 mM), 25 µl de aminoácidos (concentración final en el lisado 0.06 mM de leu y val y 0.04 mM del resto de los aminoácidos) se agita suavemente para hacer la mezcla homogénea.

III.2.8 Lisado de reticulocito de conejo dependiente de ribosomas exógenos.

Para eliminar los ribosomas endógenos del lisado de reticulocito de conejo y hacerlo dependiente de ribosomas exógenos, se centrifugó el lisado a 250 000 g durante 2 horas. Al término de la centrifugación se colectó el sobrenadante y la pastilla ribosomal se desechó.

III.2.9 Tratamiento del lisado de reticulocito de conejo con nucleasa micrococcal.

Reactivos.

-Nucleasa micrococcal (Boehringer). Se prepara una solución acuosa que contenga 15 000 unidades /ml y se almacena en alícuotas a -20°C.

EGTA. Esta solución contiene ácido etilén-glicol bis(2-amino etil-eter)-N,N'-tetraacético (EGTA) 100 mM pH=7.5 que se prepara neutralizando el ácido libre con KOH.

-tRNA. Esta solución contiene tRNA tipo V de germen de trigo (Sigma R7876) 10 mg/ml.

Método.

Para digerir el RNA mensajero endógeno del lisado de reticulocito de conejo y hacerlo dependiente de RNA mensajero exógeno, se incubaba el lisado con nucleasa micrococcal, se mezcla suavemente y se incubaba a 20°C durante 15 minutos. La digestión se detiene agregando 20 µl de EGTA 0.1 M y agitando suavemente. Una vez que se terminó el tratamiento con nucleasa, al lisado se le adicionan 6 µl de la solución de tRNA, se mezcla y está listo para usarse en el sistema de síntesis de proteínas *in vitro*.

III.2.10 Aislamiento de ribosomas funcionales de maíz.

Los ribosomas funcionales de maíz se aislaron de acuerdo con el método de Fehling y Weidner (145) con las siguientes modificaciones: los ejes embrionarios de maíz imbibidos durante 24 horas se congelan en nitrógeno líquido, se pulverizan y se homogeneizan con 4 volúmenes de buffer de extracción (ml g⁻¹) consistente en: Tris-HCl 200 mM (pH=8.5), sacarosa 200 mM, MgCl₂ 50 mM, KCl 60 mM y DTT 5 mM. El extracto se filtra a través de cuatro capas de gasa y se centrifuga a 29 000 g durante 10 minutos. Este proceso y los subsiguientes se llevan a cabo entre 2 y 4°C. El sobrenadante del paso anterior se filtra a través de Miracloth y se centrifuga de nuevo con las condiciones anteriores. El sobrenadante obtenido se coloca sobre 2 ml de un colchón de sacarosa 1.6 M (en Tris-HCl 40 mM (pH=8.5), MgCl₂ 10 mM y KCl 20 mM) y se centrifuga a 250 000 g durante 2 horas y media. Concluida la centrifugación se elimina el sobrenadante y el colchón con mucho cuidado. La pastilla ribosomal se enjuaga una vez con el buffer de resuspensión

(Hepes-KOH 20 mM (pH=7.6), $Mg(AcO)_2$ 5 mM, $KAcO$ 125 mM y β -mercaptoetanol 6 mM) y se resuspende en 50 μ l de dicho buffer con ayuda de una pipeta Pasteur de punta cerrada. Se toma una alícuota de los ribosomas resuspendidos para determinar su absorbencia a 260 nm y obtener el rendimiento como se indica a continuación.

III.2.11 Cálculo del rendimiento de ribosomas de maíz.

Para determinar el rendimiento de ribosomas se toma una alícuota de 5 μ l de los ribosomas resuspendidos y se coloca en 1 ml de agua desionizada en una celda de cuarzo. Como blanco se usa una alícuota de 5 μ l de buffer de resuspensión en 1 ml de agua. Se lee la absorbencia de la celda con ribosomas a 260 nm y la lectura obtenida se multiplica por 200 (dilución de la alícuota de ribosomas). El resultado obtenido es el rendimiento de ribosomas en D.O. a 260 nm/ml. Este resultado se multiplica por el volumen real de ribosomas obtenidos (0.05 ml en nuestro caso) para obtener el rendimiento total de ribosomas.

III.2.12 Tratamiento de los ribosomas funcionales de maíz con nucleasa micrococcal.

Reactivos.

-Nucleasa micrococcal. Se prepara una solución acuosa diluida 1:10 de nucleasa micrococcal que contenga 1500 unidades/ml y se almacena en alícuotas a $-20^{\circ}C$.

-EGTA. Se prepara una solución acuosa diluida 1:10 que contenga 10 mM de EGTA.

Método.

Por cada 50 μ l de ribosomas de maíz resuspendidos se adicionan 5 μ l de nucleasa micrococcal, se mezcla y se incuba a $20^{\circ}C$ durante 5 minutos. La digestión se detiene agregando 10 μ l de EGTA 10 mM.

III.2.13 Sistema de síntesis de proteínas in vitro.

Reactivos.

-Solución de peróxido de hidrógeno. Esta solución contiene 5 % v/v de H_2O_2 al 30 % en NaOH 1 M y se prepara antes de usarse.

-Solución de TCA con caseína. Esta solución contiene 2 % p/v de hidrolizado de caseína en 25 % p/v de ácido tricloroacético (TCA) y se prepara antes de usarse.

-Solución de TCA al 8 %. Esta solución contiene 8 % p/v de ácido tricloroacético.

-Líquido de centelleo. Esta solución contiene 4 g de 2,5 difenil oxazol (PPD), 0.05 g de (1-4-bis-2-5 feniloxazolil) benceno (POPOP) por litro de dioxano.

Método.

Se siguió la técnica descrita por Jackson y Hunt (144). Los tubos Eppendorf con los sistemas de síntesis de proteínas in vitro (ver tablas anexas) se incuban en un baño de temperatura constante a 30°C. En los tiempos indicados (0-60 minutos) se toman alícuotas de 10 µl. Las alícuotas se colocan en tubos de ensayo forrados con papel de aluminio, que contienen 0.5 ml de la solución de peróxido de hidrógeno. Al terminar de tomar las alícuotas, los tubos se colocan en el baño de temperatura constante a 37°C durante 10 minutos. Posteriormente se añaden 2 ml de la solución de TCA con caseína a cada tubo, se agitan y se colocan en hielo durante 40 minutos. El contenido de los tubos se filtra a través de filtros Whatman GF/C con vacío. Los tubos se enjuagan dos veces con 3 ml de solución de TCA al 8 % y con esta solución se lavan los filtros. Finalmente los filtros se colocan sobre hule espuma, se secan con una lámpara y se cuentan en viales con líquido de centelleo.

III.2.14 Determinación de la Km para poli-U de ribosomas de maiz tratados y sin tratar con auxina.

RNA mensajero exógeno. Esta solución contiene 1 mg/ml de poli-U como mensajero exógeno.

L-fenilalanina- ^{14}C (U). Se usó la fenilalanina uniformemente marcada con ^{14}C de New England Nuclear NEC 284 E.

Método.

Se siguió el método descrito por Jackson y Hunt (144). El lisado de reticulocito de conejo dependiente de ribosomas y de RNA mensajero exógenos, se coloca en los tubos Eppendorf estériles. Todos los pasos subsecuentes se deben efectuar con los tubos en hielo. A cada tubo se le adicionan los reactivos que se indican en las tablas adjuntas y se mezclan agitando en un vortex a velocidad media, cuidando que no se forme espuma y centrifugando a velocidad máxima en una microfuga. La reacción de síntesis de proteínas se arranca con el aminoácido radiactivo e inmediatamente después de adicionarla se toma la alícuota de tiempo cero de incubación y los tubos se colocan en el baño de temperatura constante a 30°C . Las alícuotas se tratan como se indica en el método de síntesis de proteínas. El volumen total del sistema de síntesis es de 52 μl . Las concentraciones finales en el tubo de síntesis son las siguientes: hemina 0.011 mM; creatina cinasa 27.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$; solución KM, KCl 73 mM, MgCl_2 0.365 mM; creatina fosfato 7.3 mM; aminoácidos fríos, leu y val 0.042 mM, el resto 0.028 mM; ribosomas 0.7 D.O. a 260 nm; fenilalanina 0.4056 nmoles; poli-U 2-10 μg .

-Determinación de la K_m para poli-U con los ribosomas de ejes embrionarios de maíz control (MS).

| Lisado (μ l) | poli-U | | Ribosomas MS | | H ₂ O (μ l) | [¹⁴ C]-fenilalanina | |
|----------------------|------------|------------|--------------|---------------|--------------------------------|---------------------------------|----------|
| | (μ l) | (μ g) | (μ l) | D.O. 260nm | | (μ l) | (nmoles) |
| 36 | 2 | 2 | 4 | 0.7 | 8 | 2 | 0.406 |
| 36 | 4 | 4 | 4 | 0.7 | 6 | 2 | 0.406 |
| 36 | 6 | 6 | 4 | 0.7 | 4 | 2 | 0.406 |
| 36 | 8 | 8 | 4 | 0.7 | 0 | 2 | 0.406 |

-Determinación de la K_m para poli-U con los ribosomas de ejes embrionarios de maíz tratados con auxina (AIA).

| Lisado (μ l) | poli-U | | Ribosomas AIA | | H ₂ O (μ l) | [¹⁴ C]-fenilalanina | |
|----------------------|------------|------------|---------------|---------------|--------------------------------|---------------------------------|----------|
| | (μ l) | (μ g) | (μ l) | D.O. 260nm | | (μ l) | (nmoles) |
| 36 | 2 | 2 | 2.8 | 0.7 | 9.2 | 2 | 0.406 |
| 36 | 4 | 4 | 2.8 | 0.7 | 7.2 | 2 | 0.406 |
| 36 | 6 | 6 | 2.8 | 0.7 | 5.2 | 2 | 0.406 |
| 36 | 8 | 8 | 2.8 | 0.7 | 3.2 | 2 | 0.406 |
| 36 | 10 | 10 | 2.8 | 0.7 | 1.2 | 2 | 0.406 |

Determinación de la K_m para poli-U con los ribosomas de ejes embrionarios de maiz tratados con auxina (MCPP).

| Lisado (μ l) | poli-U (μ l) | | Ribosomas MCPP (μ l) | D.O. 260nm | H ₂ O (μ l) | [¹⁴ C]-fenilalanina (μ l) | (nmoles) |
|----------------------|----------------------|----|------------------------------|---------------|--------------------------------|---|----------|
| 36 | 2 | 2 | 2.6 | 0.7 | 9.4 | 2 | 0.406 |
| 36 | 4 | 4 | 2.6 | 0.7 | 7.4 | 2 | 0.406 |
| 36 | 6 | 6 | 2.6 | 0.7 | 5.4 | 2 | 0.406 |
| 36 | 8 | 8 | 2.6 | 0.7 | 3.4 | 2 | 0.406 |
| 36 | 10 | 10 | 2.6 | 0.7 | 1.4 | 2 | 0.406 |

III.2.15 Determinación de la K_m para ribosomas de ejes de maiz tratados y sin tratar con auxinas, con poli-U como mensajero exógeno.

Los reactivos y métodos son los ya descritos en la sección 2.13, sólo que las cantidades usadas son las que se indican en las tablas que se dan a continuación. El volumen total del sistema fue de 54 μ l. Las concentraciones finales en el tubo de síntesis son las siguientes: hemina 0.0107 mM; creatina cinasa 26.7 μ g/ml; solución KM, KCl 70 mM, MgCl₂ 0.351 mM; creatina fosfato 7 mM; aminoácidos fríos, leu y val 0.04 mM, el resto 0.0267 mM; poli-U 6 μ g; fenilalanina 0.406 nmoles; ribosomas 0.15 a 2.5 D.O. a 260 nm.

-Determinación de la Km para ribosomas de ejes embrionarios de maiz control (MS).

| Lisado (μ l) | Poli-U | | Ribosomas MS | | H ₂ O (μ l) | (¹⁴ C)-fenilalanina | |
|----------------------|------------|------------|--------------|---------------|--------------------------------|---------------------------------|----------|
| | (μ l) | (μ g) | (μ l) | D.O. 260nm | | (μ l) | (nmoles) |
| 36 | 6 | 6 | 2* | 0.15 | 8.0 | 2 | 0.406 |
| 36 | 6 | 6 | 4* | 0.30 | 6.0 | 2 | 0.406 |
| 36 | 6 | 6 | 8* | 0.60 | 2.0 | 2 | 0.406 |
| 36 | 6 | 6 | 2.1 | 1.70 | 7.9 | 2 | 0.406 |
| 36 | 6 | 6 | 3.1 | 2.50 | 6.9 | 2 | 0.406 |

*Stock diluido de ribosomas resuspendidos.

-Determinación de la Km para ribosomas de ejes embrionarios de maiz tratados con auxina (AIA).

| Lisado (μ l) | Poli-U | | Ribosomas AIA | | H ₂ O (μ l) | (¹⁴ C)-fenilalanina | |
|----------------------|------------|------------|---------------|---------------|--------------------------------|---------------------------------|----------|
| | (μ l) | (μ g) | (μ l) | D.O. 260nm | | (μ l) | (nmoles) |
| 36 | 6 | 6 | 2* | 0.15 | 8.0 | 2 | 0.406 |
| 36 | 6 | 6 | 4* | 0.30 | 6.0 | 2 | 0.406 |
| 36 | 6 | 6 | 8* | 0.60 | 2.0 | 2 | 0.406 |
| 36 | 6 | 6 | 5.2 | 1.70 | 4.8 | 2 | 0.406 |

*Stock diluido de ribosomas resuspendidos.

Determinación de la K_m para ribosomas de ejes embrionarios de maiz tratados con auxina (MCPP).

| Lisado (μ l) | poli-U (μ l) (μ g) | | Ribosomas MCPP (μ l) | D.O. 260nm | H ₂ O (μ l) | ¹⁴ C-leucina (μ l) nmoles | |
|----------------------|---------------------------------|---|------------------------------|---------------|--------------------------------|--|-------|
| 36 | 6 | 6 | 2* | 0.15 | 8 | 2 | 0.406 |
| 36 | 6 | 6 | 4* | 0.30 | 6 | 2 | 0.406 |
| 36 | 6 | 6 | 8* | 0.60 | 2 | 2 | 0.406 |
| 36 | 6 | 6 | 2.1 | 1.70 | 7.9 | 2 | 0.406 |
| 36 | 6 | 6 | 3.1 | 2.50 | 6.9 | 2 | 0.406 |

* Stock diluido de ribosomas resuspendidos.

III.2.16 Determinación del error en la traducción de poli-U en un sistema heterólogo in vitro usando ribosomas de maiz tratados y sin tratar con auxina.

Reactivos:

L-fenilalanina [¹⁴C (U)]. Se usó la fenilalanina uniformemente marcada con ¹⁴C de New England Nuclear NEC 284 E (50 μ Ci/0.5 ml, 493 mCi/mmol, 0.0002028 mmol/ml).

L-leucina [¹⁴C (U)]. Se usó la leucina uniformemente marcada con ¹⁴C de New England Nuclear NEC 279 (250 μ Ci/2.5 ml, 328 mCi/mmol, 0.0003049 mmol/ml).

Espermina.- Se prepara una solución concentrada de espermina (13 mM) y a partir de ésta se hacen las diluciones adecuadas para que al aplicar 4 μ l a los tubos de síntesis de proteínas se alcancen las concentraciones finales requeridas (0, 0.1, 0.2 ó 0.4 mM).

El método se desarrolló basándose en la técnica descrita por Ruusala y Kurland (146) como se indica a continuación.

El lisado de reticulocito de conejo dependiente de ribosomas y de RNA mensajeros exógenos, se coloca en los tubos Eppendorf estériles. Los pasos subsecuentes se efectúan con los tubos a 4 °C. A cada tubo se le adicionan los reactivos que se indican en las tablas adjuntas y se mezclan por agitación en un vortex a velocidad media. La reacción de síntesis de proteínas se inicia con los ribosomas y la radiactividad. Inmediatamente se toma la alícuota de tiempo cero de incubación, los tubos se colocan en el baño de temperatura constante a 30°C y se inicia la cuenta del tiempo de incubación. A los treinta minutos se toman las siguientes alícuotas. Todas las alícuotas se tratan como se indica en el método del sistema de síntesis de proteínas (sección III.2.12). El volumen total del sistema fue de 50 µl.

Determinación del error en la traducción de poli-U de los ribosomas de maíz tratados y sin tratar con auxinas.

| Lisado (µl) | Espermina (µl) | [mM] | poli-U (µl) | (µg) | Ribosomas D.O. _{260nm} | H ₂ O (µl) | [¹⁴ C]-fenilalanina (µl) | nmoles |
|----------------|-------------------|------|----------------|------|------------------------------------|--------------------------|---|--------|
| 36 | 0 | 0.0 | 4 | 4 | 0.7 | 6 | 2 | 0.4056 |
| 36 | 4 | 0.1 | 4 | 4 | 0.7 | 2 | 2 | 0.4056 |
| 36 | 4 | 0.2 | 4 | 4 | 0.7 | 2 | 2 | 0.4056 |
| 36 | 4 | 0.4 | 4 | 4 | 0.7 | 2 | 2 | 0.4056 |

Paralelamente se corrieron experimentos similares en los que

se substituyó el aminoácido marcado. Se usó leucina en lugar de fenilalanina (se añadieron 2 μ l de leucina marcada con ^{14}C que equivalían a 0.6098 nmoles).

IV. RESULTADOS

Los resultados se agruparon en los siguientes trabajos:

I) Pérez, L., Aguilar, R. & Sánchez de Jiménez, E. (1987) Effect of exogenous auxin on maize tissues. Alteration of protein synthesis and phosphorylation. *Physiol. Plantarum* 69 517-522.

II) Pérez, L. & Sánchez de Jiménez, E. Auxin induction of ribosomal protein phosphorylation. Sometido para su publicación en la revista *Plant Physiology*.

Estos artículos se encuentran anexos.

Los aspectos más sobresalientes de estos trabajos se resumen a continuación. Se describen además otros resultados obtenidos no incluidos en estos manuscritos.

I) En estudios previos se estableció que el MCPP, una auxina sintética análoga del 2,4-D, era más eficiente que éste en la inducción y mantenimiento de callos de embriones de maíz (6,22). En el presente trabajo se estudió el efecto del MCPP en la síntesis y fosforilación de proteínas posribosomales de ejes embrionarios de maíz en las primeras 24 horas de imbibición. Los resultados obtenidos indican que aunque aparentemente las auxinas no alteran la velocidad de germinación (Fig. 1), ni los pesos seco y fresco a tiempos cortos (menores a 30 horas de incubación Tab. 1), a nivel molecular el MCPP estimula la velocidad de síntesis de proteínas y altera fuertemente el patrón de proteínas sintetizadas, a juzgar por el análisis mediante electroforesis bidimensional (Fig. 2). Existen algunas proteínas que se inducen específicamente por la auxina en tanto que hay otras que se inhiben (Fig. 2). Respecto al efecto de las auxinas en la fosforilación de las proteínas posribosomales se encontró que las auxinas estimulan este proceso.

Al analizar las proteínas fosforiladas mediante cromatografía de filtración en gel (Fig. 3) y electroforesis (Fig. 4) se encontró que el efecto de las auxinas es principalmente cuantitativo y no cualitativo, ya que en las fluorografías se observan marcas, en términos generales, las mismas proteínas que en el control.

II). En este trabajo se procedió a estudiar el efecto de las auxinas 2,4-D, MCPP y la auxina natural AIA en la fosforilación de la fracción ribosomal. Los resultados indican que las auxinas estimulan en mayor proporción la fosforilación de las proteínas de esta fracción, en relación con la fosforilación de la fracción posribosomal analizada en el trabajo anterior (Tab. 2 y 3) Asimismo al analizar, mediante electroforesis bidimensional (Fig. 5) , las proteínas ribosomales fosforiladas se observó que las auxinas estudiadas no producían el mismo efecto (Fig. 6A,B y C) y que también había un cambio en el patrón de proteínas ribosomales fosforiladas en función del tiempo en que se dió el pulso de ³²P-ortofosfato y/o la duración del mismo (Fig. 6A y D).

Para estudiar el efecto de la fosforilación de los ribosomas de maiz inducida por auxinas en la función de traducción, se procedió a montar el sistema de síntesis de proteínas *in vitro* con lisado de reticulocito de conejo. Para ello se siguió la técnica descrita por Jackson & Hunt para preparar el lisado de reticulocito de conejo y hacerlo dependiente de RNA mensajero exógeno (144). En la figura 7 se muestra la incorporación de ¹⁴C fenilalanina en el lisado original con su propio mensajero (+); se puede observar que la incorporación no es muy alta debido a que se usó fenilalanina

como aminoácido marcado. Al tratar el lisado con nucleasa para hacerlo dependiente de RNA mensajero exógeno, se disminuye prácticamente a cero la incorporación de aminoácido y al adicionar el mensajero sintético poli-U al sistema, se observa un aumento considerable en la incorporación de fenilalanina aún por encima del lisado original. Estos resultados indican que el lisado de reticulocito de conejo aislado está funcional y es dependiente de RNA mensajero exógeno (en este caso poli-U) al tratarlo con nucleasa micrococcal.

A continuación se trató el lisado como se describe en materiales y métodos y se montó el sistema heterólogo de síntesis de proteínas *in vitro* (lisado de reticulocito de conejo con ribosomas de maiz aislados de tejido control y de tejido tratado con auxinas). Los ribosomas funcionales de maiz se aislaron de acuerdo a la técnica descrita por Fehling & Weidner (145). Los resultados se muestran en las figuras 8,9 y 10 y nos indican que los ribosomas de maiz aislados de tejido tratado con auxinas, no se comportan de igual manera que los ribosomas aislados de tejido control en el sistema heterólogo y tienen distinta susceptibilidad a la nucleasa micrococcal.

Para estudiar más a fondo y cuantificar de alguna manera las diferencias en el comportamiento de los ribosomas, se procedió a optimizar el sistema de síntesis de proteínas heterólogo *in vitro* con poli-U como mensajero exógeno para los tres tipos de ribosomas estudiados. Los resultados se muestran en la figura 11 para los ribosomas MS y los valores de K_m obtenidos para los ribosomas estudiados se encuentran en la tabla 4. Estos resultados indican que los tres tipos de ribosomas (MS= aislados de tejido control,

MCPP= aislados de tejido tratado con MCPP y AIA=aislados de tejido tratado con AIA) se saturan con cantidades similares de poli-U.

A continuación se estudió la dependencia del sistema, con RNA mensajero sintético poli-U en concentraciones saturantes, de la concentración de ribosomas probando los tres tipos estudiados. Los resultados se muestran en forma de doble recíproca regraficados en la figura 12, en la que se observan valores significativamente distintos en la K_m del poli-U hacia los ribosomas del tejido control en relación a los ribosomas del tejido tratado con AIA y con MCPP (Tab. 5). Estas diferencias en los valores de K_m sugieren diferencias en la afinidad de estos ribosomas por el mensaje sintético poli-U.

Por otra parte se montó la técnica para medir el error que producían estos ribosomas en la lectura del mensaje sintético poli-U. Para ello se hicieron experimentos simultáneos en los que se ponía en uno fenilalanina marcada con ^{14}C (codón UUU), en tanto que en el otro experimento se ponía leucina marcada con ^{14}C (codón UUC), a los sistemas de síntesis de proteínas *in vitro*. Se sabe que la espermina disminuye el error en la traducción (147,148). Por ello se probó también el efecto de esta poliamina en el sistema. Estos experimentos se repitieron con los tres tipos de ribosomas (MS, MCPP y AIA). Los resultados preliminares indican que en ausencia de espermina los ribosomas de tejido tratado con auxina (MCPP y AIA) muestran más error que los ribosomas aislados de tejido control (MS). Al adicionar espermina a estos sistemas el error disminuye (espermina en concentraciones 0.1 y 0.2 mM); sin embargo, al aumentar aún más la concentración de espermina el error se incrementa nuevamente (0.4 mM de espermina) (Tab. 6).

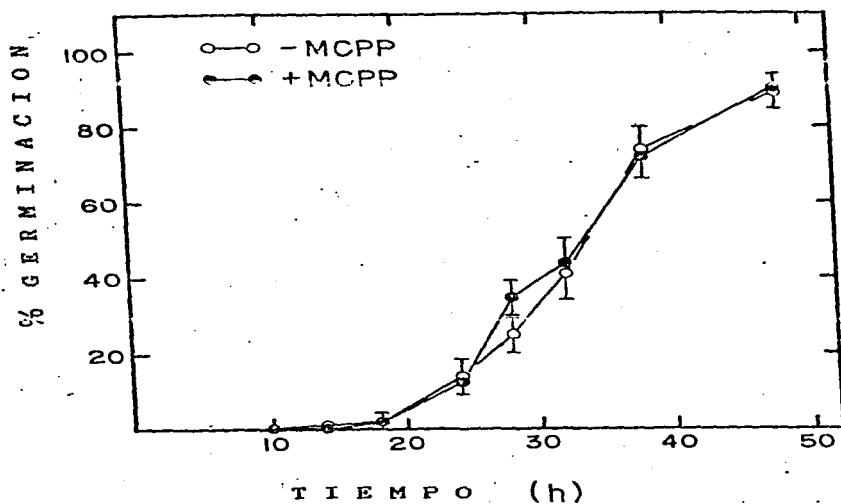


Figura 1. Efecto de las auxinas en la germinación de maíz. Las semillas de maíz fueron germinadas en la oscuridad a 25°C entre dos capas de algodón humedecidas con agua desionizada estéril (o) o con una solución de MCPP (5 mg/l) (●). Los valores son las medias de cuatro experimentos con cincuenta semillas cada uno +/-DE.

TABLA 1

Determinación del peso fresco y peso seco de ejes embrionarios de maíz durante la germinación.

| Tiempo (h) | Peso fresco (g) | | Peso seco (g) | |
|---------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Control | MCPF | Control | MCPF |
| 14 | 0.347 [±] 0.005 | 0.345 [±] 0.018 | 0.176 [±] 0.003 | 0.190 [±] 0.010 |
| 18 | 0.378 [±] 0.001 | 0.365 [±] 0.012 | 0.171 [±] 0.002 | 0.173 [±] 0.007 |
| 24 | 0.421 [±] 0.006 | 0.426 [±] 0.022 | 0.157 [±] 0.005 | 0.164 [±] 0.016 |
| 28 | 0.520 [±] 0.032 | 0.520 [±] 0.027 | 0.177 [±] 0.017 | 0.177 [±] 0.005 |
| 32 | 0.530 [±] 0.046 | 0.670 [±] 0.056 | 0.162 [±] 0.001 | 0.182 [±] 0.012 |
| 38 | 0.970 [±] 0.073 | 1.270 [±] 0.093 | 0.219 [±] 0.001 | 0.254 [±] 0.005 |

Los valores son las medias de cuatro experimentos independientes con cincuenta semillas cada uno [±]D.E. La concentración de MCPF fue de 5 mg/l.

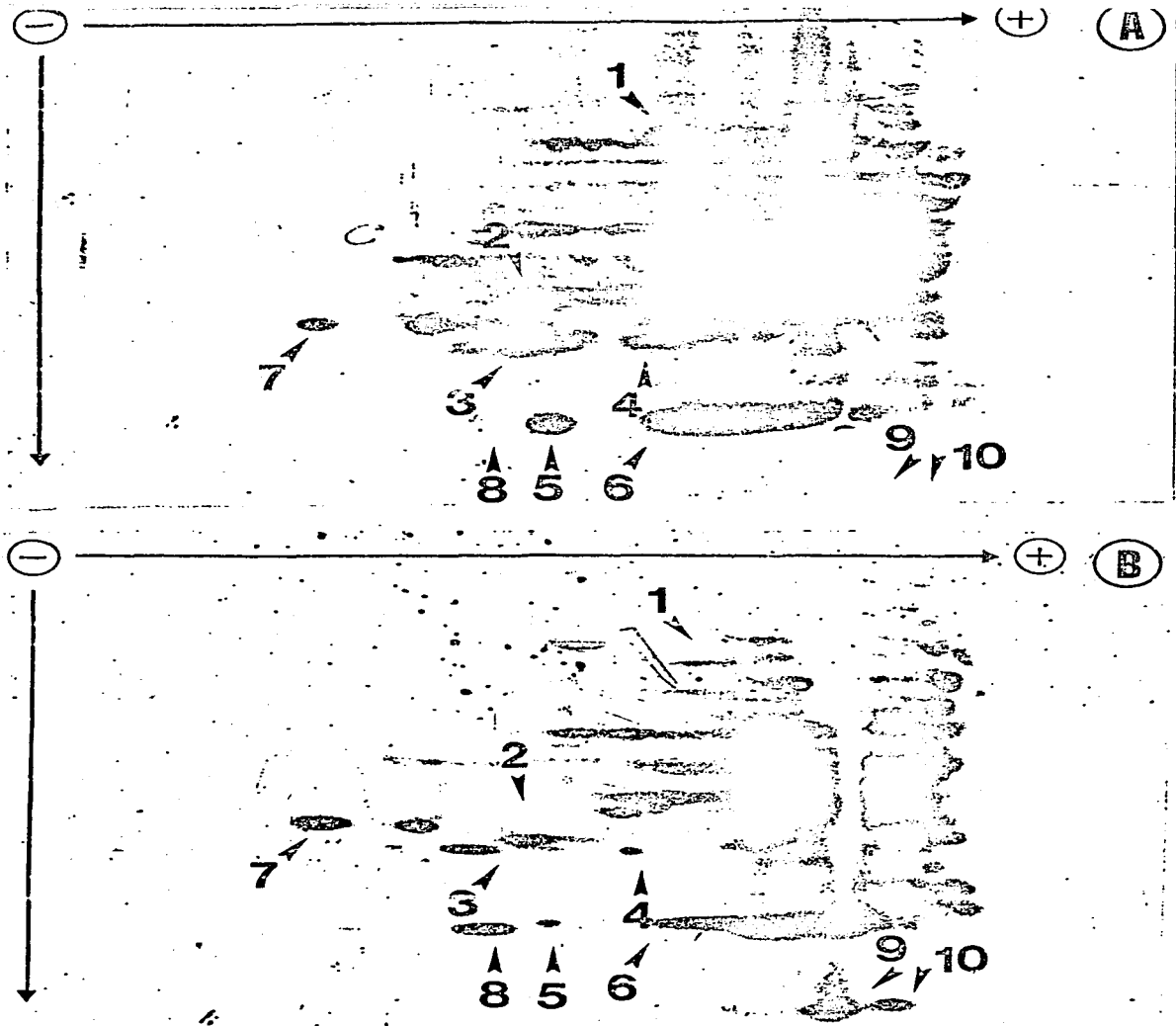


Figura 2. Fluorografías de las proteínas sintetizadas por los ejes embrionarios de maíz durante la germinación.

Los ejes embrionarios de maíz (500 mg) se imbibieron sin (A) o con (B) MCPP (5 mg/l). En el periodo de las 18-24 h de imbibición se les dió un pulso de una mezcla de aminoácidos marcados con ^{14}C . Se aislaron las proteínas del sobrenadante posribosomal y se analizaron por electroforesis en dos dimensiones y fluorografías.

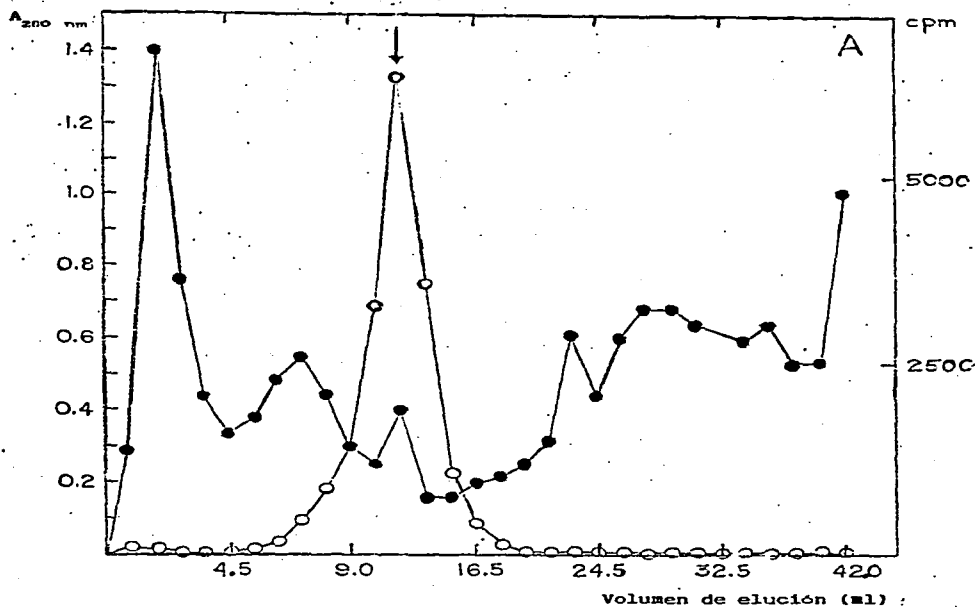


Figura 3. Separación de las proteínas fosforiladas en el sobrenadante posribosomal mediante cromatografía de filtración en gel.

Las proteínas del sobrenadante posribosomal (aproximadamente 30 000 cpm) se aplicaron a una columna de filtración en gel (Sephadex G-100 de 0.9 x 25 cm. Se colectaron fracciones de 1 ml (●) A_{260 nm} (o) cpm.

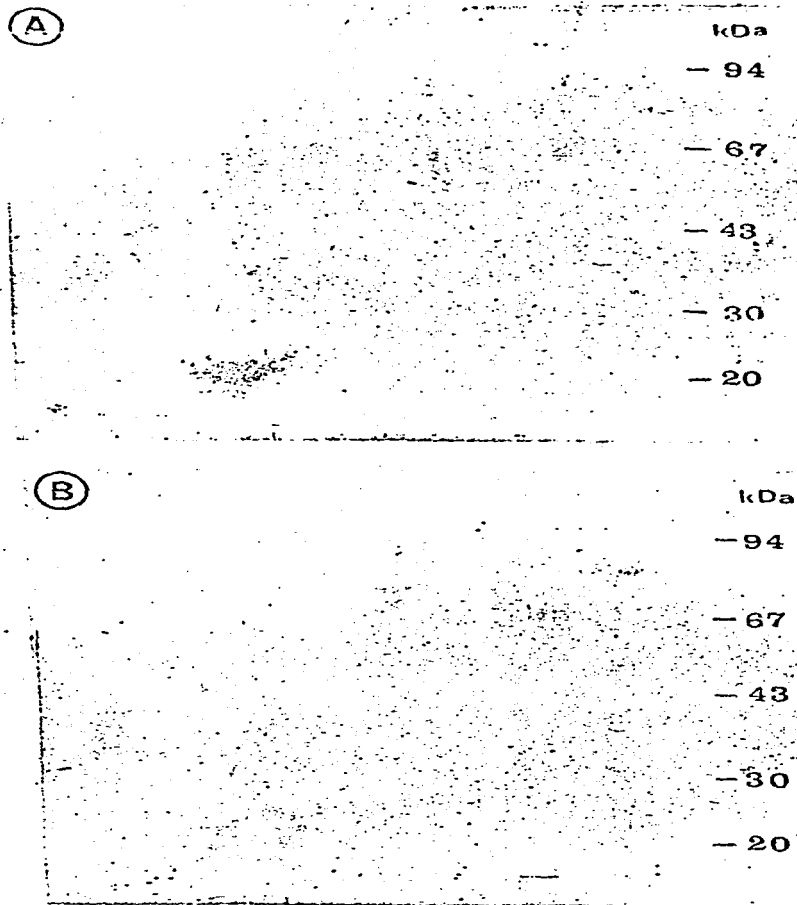


Figura 4. Fluorografías de las fosfoproteínas del sobrenadante posribosomal.

Los ejes embrionarios de maíz (500 mg) se imbibieron sin (A) o con (B) MCPP (5 mg/l). De las 22 a las 24 h se les dió un pulso de [32 P]-fosfato. Las proteínas del sobrenadante posribosomal se analizaron por electroforesis en dos dimensiones y fluorografías.

TABLA 2

Distribución de la incorporación de ^{32}P en las fracciones soluble y ribosomal

| Fracción | Incorporación de ^{32}P (cpm mg^{-1}) |
|-----------|--|
| Soluble | 530 146 |
| Ribosomal | 43 250 |

Se incubó un g. de ejes embrionarios de maíz en medio MS en presencia de ^{32}P -ortofosfato. Cada fracción proteica se precipitó con TCA al 10 %, se resuspendió y se contó en un contador de centelleo.

TABLA 3
Incorporación de ^{32}P en distintas fracciones proteicas

| Proteínas purificadas | Incorporación de ^{32}P (cpm mg^{-1}) | | |
|--------------------------|--|-------------------------------|------------------------------|
| | Control | +MCPP (5 mg l^{-1}) | +AIA (5 mg l^{-1}) |
| Histonas nucleares | 10 607 | 6 724 | 10 556 |
| Proteínas ribosomales | 34 713 | 64 809 | 59 337 |

Se incubó 1 g de ejes embrionarios en medio MS con o sin auxinas en presencia de ^{32}P -ortofosfato. Cada fracción proteica se precipitó con TCA al 10 % se resuspendió y se contó en un contador de centelleo.



Figura 5 Patrón bidimensional de proteínas ribosomales de maiz. Las proteínas ribosomales se aislaron como se indica en la sección de materiales y métodos y se separaron de acuerdo a la técnica de Madjar (12). Se aplicaron 100 μ g de proteínas. En la primera dimensión (sistema ácido) la migración fue hacia el catodo a 150 v (voltaje constante) por 5 h (con menos de 1 mA/gel). La segunda dimensión fue en presencia de SDS.

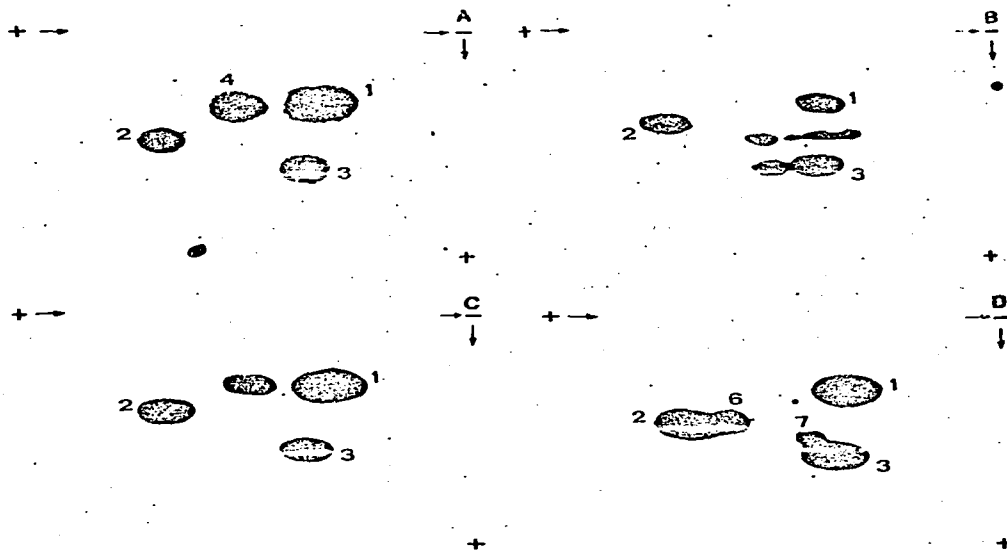


Figura 6. Fluorografía de las proteínas ribosomales marcadas con ^{32}P . La electroforesis en dos dimensiones se llevó a cabo siguiendo el procedimiento de Madjar (sistema ácido en la primera dimensión/sistema con SDS en la segunda dimensión). El pulso fue de 3 con ^{32}P entre las 21 y 24 h (A,C,D) o de 0.5 h entre las 23.5 a las 24 h (B). (A)=control pulso largo, (B)=control pulso corto, (C)=+AIA, (D)=+MCP.

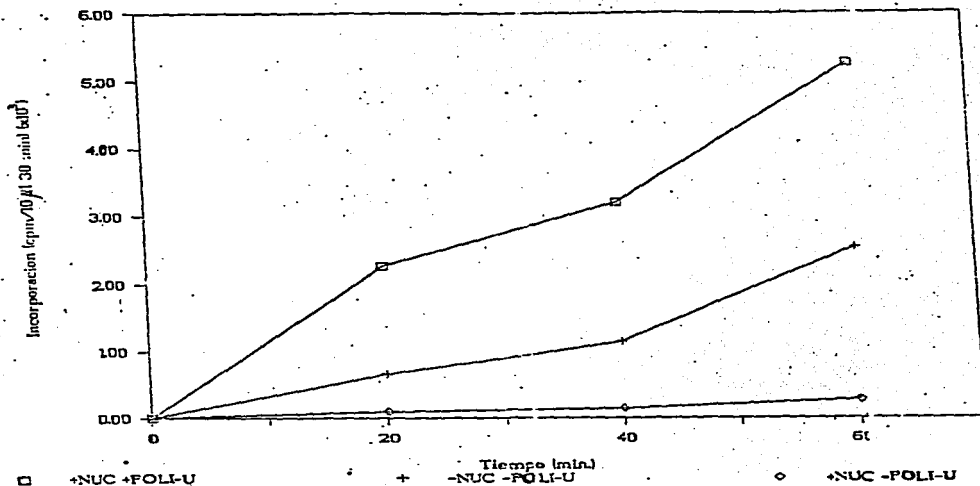


Figura 7. Incorporación de ^{14}C -fenilalanina en el sistema homólogo de síntesis de proteínas *in vitro*. El lisado de reticulocito de conejo se aisló de acuerdo con el método de Jackson y Hunt (144). (a) Incorporación de ^{14}C -fenilalanina en el lisado con el RNA mensajero endógeno (+). (b) Incorporación de ^{14}C -fenilalanina en el lisado tratado con nucleasa (150 U de nucleasa micrococcal/ml de lisado) (\diamond). (c) Incorporación de ^{14}C -fenilalanina en el lisado tratado con nucleasa y adicionado con poli-U como mensajero exógeno (2 μg de poli-U/20 μl de sistema de síntesis de proteínas) (\square).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

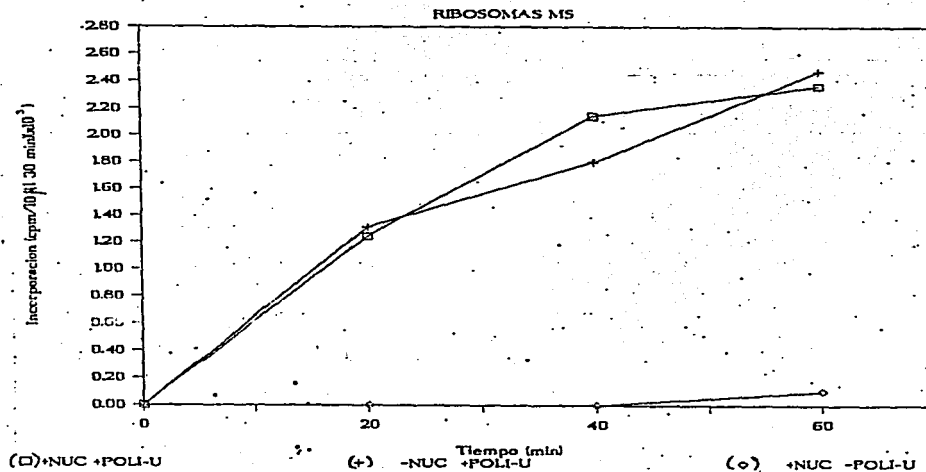


Figura 8. Incorporación de ^{14}C -fenilalanina en el sistema heterólogo de síntesis de proteínas *in vitro* con ribosomas de maíz control. El lisado de reticulocito de conejo se centrifugó a alta velocidad (250 000 g por 2 horas), para eliminar los ribosomas endógenos. El sobrenadante posribosomal del lisado se trató con nucleasa para eliminar los RNA mensajeros endógenos. Paralelamente se aislaron ribosomas funcionales de ejes embrionarios de maíz incubados en medio MS (control = Ribosomas MS), de acuerdo a la técnica descrita por Fehling y Weidner (145). (a) Incorporación de ^{14}C -fenilalanina en el lisado adicionado con ribosomas MS (sin tratar con nucleasa) y con poli-U (+). (b) Incorporación de ^{14}C -fenilalanina en el lisado adicionado con ribosomas MS (tratados con nucleasa) (Δ). (c) Incorporación de ^{14}C -fenilalanina en el lisado adicionado con ribosomas MS (tratados con nucleasa) y con poli-U como mensajero exógeno (\square).

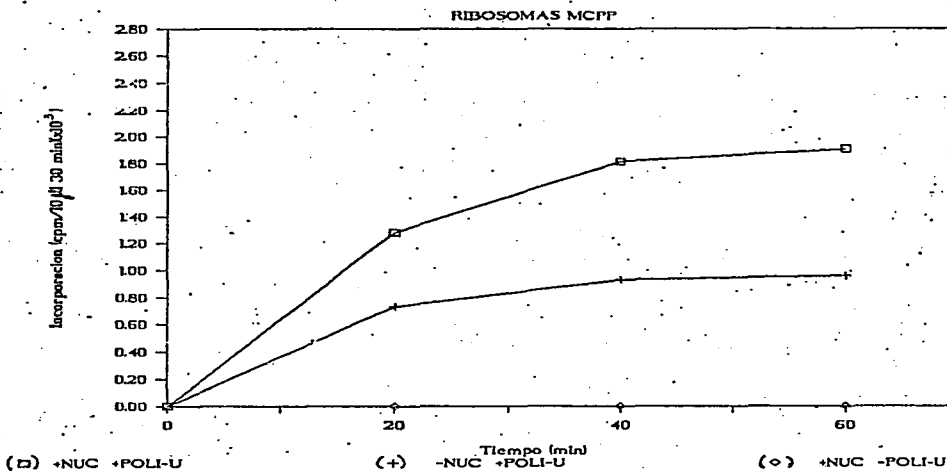


Figura 9. Incorporación de ^{14}C -fenilalanina en el sistema heterólogo de síntesis de proteínas *in vitro* con ribosomas de maíz con MCPP.

El lisado de reticulocito de conejo se centrifugó a alta velocidad (200 000 g por dos horas), para eliminar los ribosomas endógenos. El sobrenadante posribosomal del lisado se trató con nucleasa para eliminar los RNA mensajeros endógenos. Paralelamente se aislaron ribosomas funcionales de ejes embrionarios de maíz incubados en medio MS + MCPP (Ribosomas MCPP), de acuerdo a la técnica descrita por Fehling y Weidner (145). (a) Incorporación de ^{14}C -fenilalanina en el lisado adicionado con ribosomas MCPP (sin tratar con nucleasa) y con poli-U (+). (b) Incorporación de ^{14}C -fenilalanina en el lisado adicionado con ribosomas MCPP (tratados con nucleasa) (\diamond). (c) Incorporación de ^{14}C -fenilalanina en el lisado adicionado con ribosomas MCPP (tratados con nucleasa) y con poli-U como mensajero exógeno (\square).

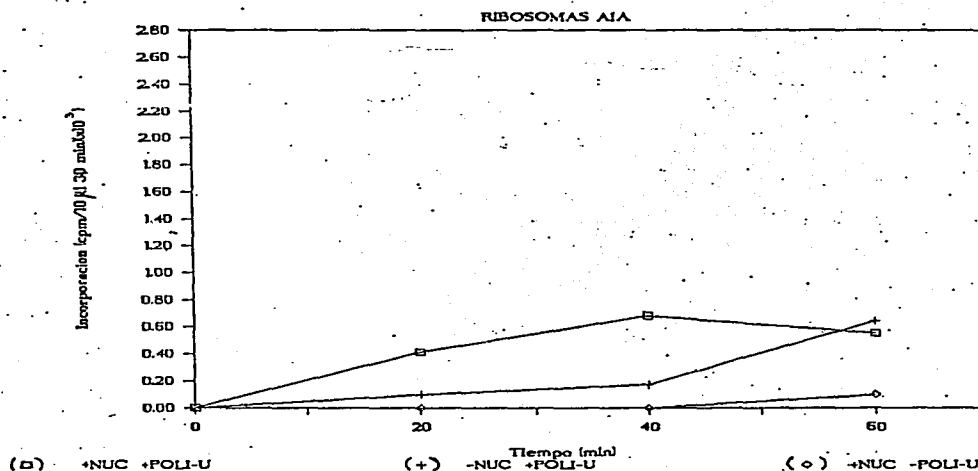


Figura 10 . Incorporación de ^{14}C -fenilalanina en el sistema heterólogo de síntesis de proteínas *in vitro* con ribosomas de maíz con AIA.

El lisado de reticulocito de conejo se centrifugó a alta velocidad (200.000 g por 2 horas), para eliminar los ribosomas endógenos. El sobrenadante posribosomal del lisado se trató con nucleasa para eliminar los RNA mensajeros endógenos. Paralelamente se aislaron ribosomas funcionales de ejes embrionarios de maíz incubados en medio MS + AIA (Ribosomas AIA), de acuerdo a la técnica descrita por Fehling y Weidner (145). (a) Incorporación de ^{14}C -fenilalanina en el lisado adicionado con ribosomas AIA (sin tratar con nucleasa) y con poli-U (+). (b) Incorporación de ^{14}C -fenilalanina en el lisado adicionado con ribosomas AIA (tratados con nucleasa) (◇). (c) Incorporación de ^{14}C -fenilalanina en el lisado adicionado con ribosomas AIA (tratados con nucleasa) y con poli-U como mensajero exógeno (□).

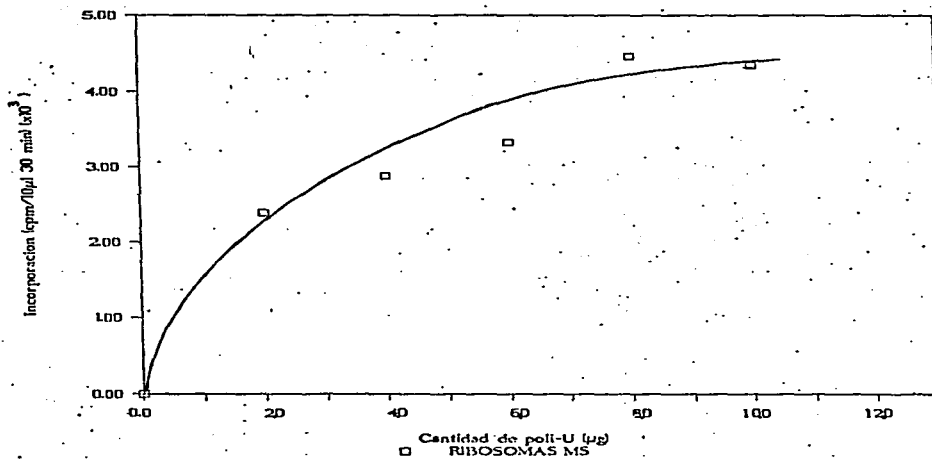


Figura 11 . Determinación de la K_m para poli-U.
El lisado de reticulocito de conejo dependiente de ribosomas y mensajero exógenos se adicionó con ribosomas MS y con distintas cantidades de poli-U (0.0 a 12.0 μg) para determinar el valor de la K_m de estos ribosomas hacia el poli-U como mensajero exógeno.

TABLA 4

Determinación de la K_m para poli-U de ribosomas de maiz tratados y sin tratar con auxinas.

| Fuente de ribosomas | K_m (μg de poli-U) |
|-----------------------|----------------------------------|
| Tejido control (MS) | 4.4 +/- 0.3 |
| Tejido + MCP (5 mg/l) | 4.8 +/- 0.4 |
| Tejido + AIA (5 mg/l) | 5.1 +/- 0.4 |

El lisado de reticulocito de conejo dependiente de ribosomas y mensajero exógeno se adicionó con ribosomas de maiz de tres fuentes distintas (ribosomas control, ribosomas MCP y ribosomas AIA). Los tres sistemas anteriores se adicionaron con distintas cantidades de poli-U (0.0 a 12.0 μg) para determinar el valor de la K_m de estos ribosomas hacia el poli-U como mensajero exógeno. Los valores de las K_m obtenidos a partir de las regráficas se indican en la tabla.

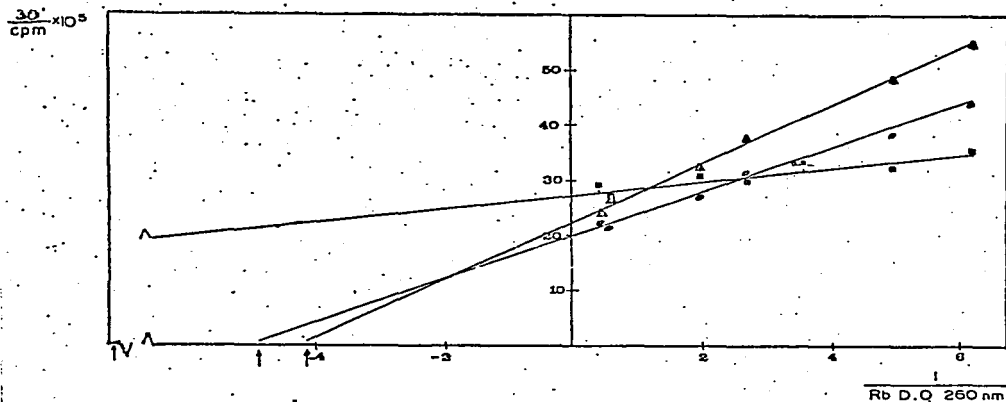


Figura 12. Determinación del valor de K_m para los ribosomas de maiz tratados y sin tratar con auxinas, con poli-U como mensajero exógeno.

El lisado de reticulocito de conejo dependiente de ribosomas y mensajero exógenos se adiciónó con poli-U en una cantidad saturante. Posteriormente se añadieron cantidades variables (0.16 a 2.5 D.O. a 260 nm) de los ribosomas de maiz del tejido estudiado para determinar la K_m del mensajero poli-U hacia cada uno de los tipos de ribosomas estudiados. Se presentan las regráficas de los valores obtenidos. \square (control), \blacktriangle (MCPP), \bullet (AIA).

TABLA 5

Determinación del valor de K_m para los ribosomas de maiz tratados y sin tratar con auxinas, con poli-U como mensajero exógeno.

| Fuente de ribosomas | K_m (Rb D.O. 260 nm) |
|------------------------|------------------------|
| Tejido control | 0.049 +/- 0.019 |
| Tejido + MCPP (5 mg/l) | 0.197 +/- 0.052 |
| Tejido + AIA (5 mg/l) | 0.176 +/- 0.047 |

El lisado de reticulocito de conejo dependiente de ribosomas y mensajero exógenos se adicionó con poli-U en una cantidad saturante. Posteriormente se añadieron cantidades variables (0.16 a 2.50 D.O. a 260 nm) de los ribosomas de maiz del tejido estudiado para determinar la K_m del mensajero poli-U hacia cada uno de los tipos de ribosomas estudiados. Los valores de las K_m obtenidos a partir de las regráficas de la figura 12 se indican en la tabla.

TABLA 6

Determinación de la frecuencia de error en la traducción de poli-U en un sistema heterólogo de síntesis de proteínas *in vitro* usando ribosomas de maiz tratados y sin tratar con auxinas.

| Fuente de ribosomas | Concentración de espermina (mM) | | | |
|-----------------------|---------------------------------|-----|-----|------|
| | 0.0 | 0.1 | 0.2 | 0.4 |
| Tejido control | 6.4 | 1.2 | 3.8 | 13.2 |
| Tejido + MCPP (5mg/l) | 11.5 | 2.5 | 0.0 | 15.3 |
| Tejido + AIA (5 mg/l) | 15.4 | 4.4 | 7.1 | 8.3 |

El lisado de reticulocito de conejo dependiente de ribosomas y mensajero exógenos se adicionó con distintas concentraciones de espermina. Para cada una de estas concentraciones se preparan dos sistemas de síntesis de proteínas con los distintos tipos de ribosomas estudiados. En uno de estos sistemas se usa ^3H -fenilalanina con poli-U, en tanto que en el otro sistema se usa ^{14}C -leucina con el mismo mensaje. La frecuencia de error se determina midiendo las incorporaciones en cada sistema y sacando la siguiente relación: $\frac{\text{cpm de } ^{14}\text{C-leucina incorporadas}}{\text{cpm de } ^3\text{H-C-leucina} + \text{cpm } ^{14}\text{C-fenilalanina incorporadas}} \times 100$.

Effect of an exogenous auxin on maize tissues. Alteration of protein synthesis and phosphorylation

L. Pérez, R. Aguilar and E. Sánchez-de-Jiménez

Pérez, L., Aguilar, R. and Sánchez-de-Jiménez, E. 1987. Effect of an exogenous auxin on maize tissues. Alteration of protein synthesis and phosphorylation. - *Physiol. Plantarum* 69: 517-522.

A synthetic auxin 2-(2-methyl-4-chloro)phenoxypropionic acid (MCPP), analogue of 2,4-D, alters maize (*Zea mays* L. H-30) germination while inducing callus formation. The effect of this auxin on protein synthesis and phosphorylation of the embryonic tissues was explored. Total cytoplasmic proteins were analysed for ¹⁴C or ³²P incorporation into trichloroacetic acid precipitable material. MCPP significantly stimulated protein synthesis as well as protein phosphorylation. The protein synthesis pattern was highly altered in the presence of MCPP as analysed by two-dimensional gel electrophoresis. Analyses by Sephadex G-100 chromatography and by two-dimensional gel electrophoresis of phosphorylated proteins indicate that the effect of MCPP on protein phosphorylation was only quantitative.

Additional key words - Auxin-sensitive proteins, embryonic axis, phosphoproteins, *Zea mays*.

L. Pérez, R. Aguilar and E. Sánchez-de-Jiménez (reprint requests), Depto. de Biología Vegetal, DEPg, Facultad de Química, U.N.A.M., 04510 México, D.F. México.

Introduction

Synthetic auxins have been widely used to induce callus formation from different plant cereal tissues (Yamada 1977). The mechanism behind such a dedifferentiation is not known, however.

Several research groups have reported an increase of protein as well as of RNA synthesis in auxin-treated tissues (Domínguez et al. 1977, Jacobsen and Higgins 1978, Theologis and Ray 1982). These results suggest that the primary auxin action might be at the transcriptional level (Hagen and Guilloyle 1985). Lately, an increase of protein phosphorylation in auxin-treated artichoke tissues has also been reported (Melanson and Trewavas 1982).

Application of exogenous 2,4-D (Green et al. 1974) or its analogue MCPP (Sánchez de Jiménez et al. 1981) to germinating maize embryos causes cell dedifferentiation and callus production instead of normal plantlet development. Protein synthesis is one of the earliest processes to be detected during seed imbibition, presum-

ably following a genetic pre-established program based on long-lived (stored) and newly synthesized mRNAs (Brooker et al. 1978, Sánchez de Jiménez and Aguilar 1984, Suzuki and Minamikawa 1985). The pattern of proteins synthesized during this process has been well documented by us (Aguilar and Sánchez de Jiménez 1984, Sánchez de Jiménez and Aguilar 1984, Baiza et al. 1986). Based on the above information we are interested in using this system as a model for examining the molecular basis for auxin participation in cell dedifferentiation.

Abbreviations - 2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; IAA, indole-3-acetic acid; MCPP, 2-(2-methyl-4-chloro)phenoxypropionic acid; MS, Murashige and Skoog (1962) medium; TCA, trichloroacetic acid.

Materials and methods

Seeds of the hybrid maize (*Zea mays* L.) H-30, for high temperate areas, were used for the work. Embryonic

Received 7 July 1986; revised 6 October, 1986

axes were manually cut off from the seeds, surface-sterilized using 70% ethanol (30 s) followed by 5% Ca (ClO), for 10 min, and rinsed twice with sterile water before the experiments. Sterile axes were incubated on mineral salts of MS medium according to Murashige and Skoog (1962) with the addition of 26 μ M glycine, 55 μ M *myo*-inositol, 4 μ M nicotinic acid, 24 μ M pyridoxal, 3 μ M thiamine, 87.6 mM sucrose and 7.5 g agar (Difco) per l of medium, pH 5.8, in 2 \times 10 cm tubes. For callus induction 5 to 10 mg l⁻¹ of either IAA, 2,4-D or MCPP were added to the medium and incubation was carried out in darkness at 25°C (Sánchez de Jiménez and Albores 1979).

Germination curves

Batches of 50 seeds were surface sterilized as above, imbibed with double-distilled water or MCPP (0.1 to 10 mg l⁻¹) on cotton and incubated at 25°C in darkness for different periods of time, from 14 to 48 h. At each stated time, germinated seeds (i.e. radicle protruded) were counted and embryonic axes from all the seeds of this group were sectioned and weighed (fresh weight). The axes were dried at 60°C under vacuum until constant weight (dry weight)

Protein labelling with radioisotopes and radioactive measurements

Maize embryonic axes (300 mg) were incubated on MS medium with or without MCPP (5 mg l⁻¹) for 24 h at 25°C in darkness. A pulse of either 1.11 MBq of [¹⁴C]-amino acid mixture (3.7 MBq ml⁻¹, New England Nuclear) or 11.1 MBq of [³²P]-phosphate (37 MBq ml⁻¹, Amersham International) was added during the last 3 h (21–24 h) of the incubation period. After this time, post-ribosomal proteins were isolated from the embryonic axes as previously reported (Sánchez de Jiménez and Aguilar 1984). [¹⁴C]-Amino acid and [³²P]-phosphate uptake were measured in total homogenate (37800 \pm 3680 cpm mg⁻¹ and 157000 \pm 15700 cpm mg⁻¹ of tissue, respectively). Proteins were precipitated with trichloroacetic acid (TCA; final concentration 10%, w/v), washed with 5% (w/v) TCA and ethanol, re-suspended in water and neutralized with 5 M KOH. Incorporation of [¹⁴C]-amino acids or [³²P]-phosphate was determined in duplicate in 100 μ l aliquots of the samples by using a liquid scintillation spectrometer (Packard Tri Carb Instruments 3255), following Bray's method (1972). Proteins were analysed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and fluorography. Protein concentration was measured by the method of Lowry et al. (1951).

Polyacrylamide gel electrophoresis

Polyacrylamide gel electrophoresis was carried out according to Laemmli (1970) (one dimension, slab gels) or

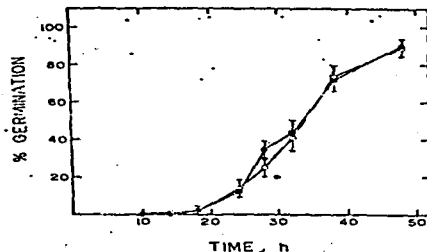


Fig. 1. Effect of auxin on seed germination. Maize seeds were germinated in the dark at 25°C between two layers of cotton wool moistened with either double distilled water (\circ) or 5 mg l⁻¹ of MCPP (\bullet). Values are means of four independent experiments with 50 seeds each \pm SD.

O'Farrell (1975) (two dimensions), except that 7–15% SDS-polyacrylamide plates were used in the second dimension. Fluorographs of the gels were obtained by the method of Bonner and Laskey (1974).

Fractionation of phosphorylated proteins (P-proteins)

Three mg of post-ribosomal proteins labelled with [³²P]-phosphate were applied to a 0.9 \times 24.5 cm Sephadex G-100 (Pharmacia) column equilibrated with buffer A (50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM 2-mercaptoethanol, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6). Proteins were eluted with 40 ml of the same buffer at 4°C. One ml fractions were collected, analyzed at 280 nm and counted as indicated above.

Results

Induction of maize callus tissue was achieved with either IAA, 2,4-D or its analogue MCPP (ranging from 5 to 10 mg l⁻¹). With IAA, however, callus induction was very poor and in many cases the process reverted, resulting in normal plantlets after 3–4 weeks of incubation. MCPP gave the largest callus (Sánchez de Jiménez et al. 1981) in a shorter time (4–5 days). Callus induction by MCPP was achieved even if the embryos were exposed to this auxin for a period as short as 6 h within the germination period (0 to 24 h). The effect of MCPP on the rate of seed germination was analysed. Figure 1 shows that 70 to 80% of seeds of both the control and one of the MCPP treatments (5 mg l⁻¹) had germinated by 37–41 h. MCPP did not have a significant effect on the rate of germination at any concentration tested (0, 1–10 mg l⁻¹, data not shown). The fresh and dry weights of the axes were recorded at the end of each experimental period. As observed in Tab. 1, both fresh and dry weights in-

Tab. 1. Fresh and dry weights of maize embryonic axes. Values are means of four independent experiments with 50 seeds each \pm SD. The concentration of MCPP was 5 mg l⁻¹.

| Time (h) | FW (g) | | DW (g) | |
|----------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Control | MCPP | Control | MCPP |
| 14 | 0.347 \pm 0.005 | 0.345 \pm 0.018 | 0.176 \pm 0.003 | 0.190 \pm 0.010 |
| 18 | 0.378 \pm 0.001 | 0.365 \pm 0.012 | 0.171 \pm 0.002 | 0.173 \pm 0.007 |
| 24 | 0.421 \pm 0.005 | 0.426 \pm 0.022 | 0.157 \pm 0.005 | 0.164 \pm 0.016 |
| 28 | 0.520 \pm 0.032 | 0.520 \pm 0.027 | 0.177 \pm 0.017 | 0.177 \pm 0.005 |
| 32 | 0.530 \pm 0.046 | 0.670 \pm 0.056 | 0.162 \pm 0.001 | 0.182 \pm 0.012 |
| 38 | 0.970 \pm 0.073 | 1.270 \pm 0.093 | 0.219 \pm 0.001 | 0.254 \pm 0.005 |

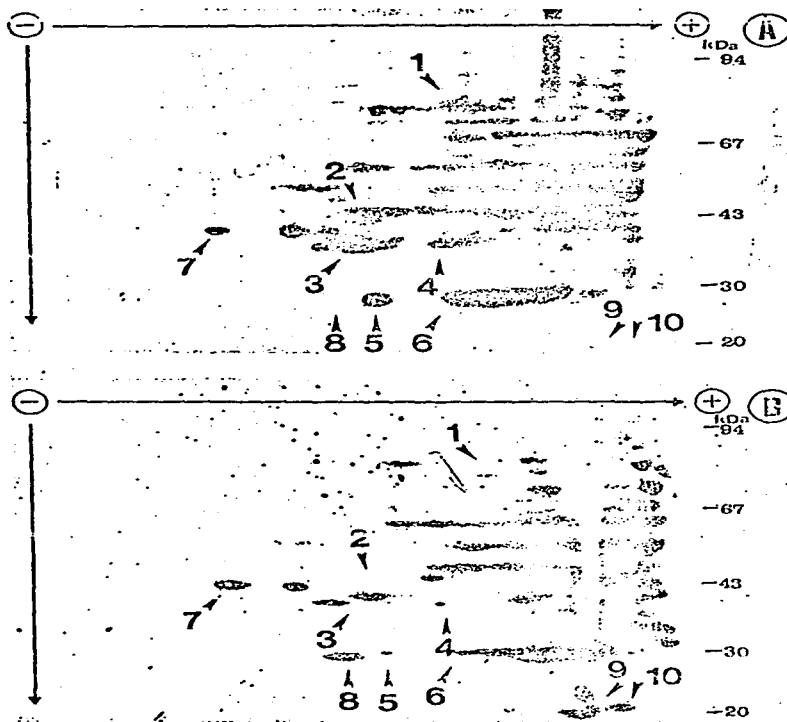


Fig. 2. Fluorographs of protein synthesized by maize embryonic axes during germination. Maize embryonic axes (500 mg) were imbibed without (A) or with (B) MCPP (5 mg l⁻¹). A pulse of [¹⁴C]-labelled amino acid mixture was given between 18–24 h. Post-ribosomal proteins were isolated and analyzed by two-dimensional gel electrophoresis and fluorography.

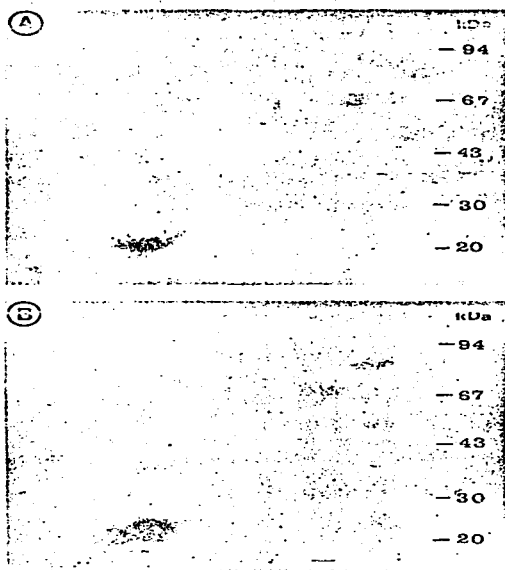


Fig. 3. Fluorographs of post-ribosomal phosphoproteins. Maize embryonic axes (500 mg) were imbibed without (A) or with (B) MCPP (5 mg l^{-1}). A pulse of [^{32}P]-phosphate was given between 22–24 h. Post-ribosomal proteins were analysed by two-dimensional gel electrophoresis and fluorography.

creased significantly by MCPP treatment only at longer incubation periods (32 to 38 h; ($P \leq 0.01$)).

To analyse the biochemical action of MCPP on germination, embryonic axes were incubated in MS medium under sterile conditions, and a 3 h pulse of [^{14}C]-amino acid mixture in the absence or presence of 5 mg l^{-1} of MCPP was applied. The post-ribosomal proteins were isolated from these tissues and the ^{14}C incorporation into these proteins was determined. MCPP treatment caused a 41% increase in the amount of labelled amino acids incorporated into proteins. Proteins were further analysed by two-dimensional gel electrophoresis and fluorography. The protein pattern obtained with MCPP (Fig. 2B) differed clearly from the control (Fig. 2A), revealing both quantitative and qualitative changes. It is interesting to note that the levels of some proteins decreased drastically (spots 1–6) in the presence of MCPP

(Fig. 2B), whereas, other proteins (spots 7–10) increased.

The effect of MCPP on protein phosphorylation was also tested. Maize embryonic axes were incubated for 3 h (21 to 24 h period) with [^{32}P]-phosphate in the medium with and without MCPP. The post-ribosomal proteins were again isolated and the ^{32}P incorporation into TCA-precipitable material was determined. An increase of 49–62% on total ^{32}P incorporation was detected in the presence of the synthetic auxin.

The phosphoproteins were further analysed by Sephadex G-100 filtration chromatography and two-dimensional gel electrophoresis. Two main peaks of proteins were obtained on the Sephadex column, both for the control and after MCPP treatment: one larger within the void volume containing the bulk of the proteins and a second smaller one with proteins of lower molecular weight. The phosphoproteins eluted as one major peak within the second protein peak, although a small but reproducible amount of phosphoproteins was also detected within the peak of higher molecular weight proteins. This distribution was found on both control and MCPP samples (data not shown).

Two-dimensional gel electrophoresis and fluorography of all these proteins showed (Fig. 3) a restricted group of similarly labelled proteins, both in the case of control and MCPP-treated samples. None of the major spots however, seemed to correspond to specific auxin-modulated proteins shown in Fig. 2. A major spot was located at a low M_r (ca 22 kDa), which was the spot increasing most noticeably by MCPP treatment. Thus the stimulation of protein phosphorylation by MCPP on germinating maize embryos seems to be only quantitative, since the same phosphoproteins present in the tissue during normal germination also increase upon synthetic auxin treatment.

Discussion

The molecular mechanism of auxin action is not known. Recently, research has been focussed on analysing biochemical events behind each specific physiological effect caused by auxin: cell wall restoration (Meyer et al. 1984a), cell elongation (Theologis and Ray 1982, Walker et al. 1985), and cell division (Melanson and Trewas 1982, Meyer et al. 1984b). In all systems studied a common feature is that auxin regulates protein synthesis and/or protein phosphorylation. In the present case the same features were observed. MCPP did not significantly affect the rate of seed germination (Fig. 1). However, the induction of cell dedifferentiation to form callus tissue also involved, as early events, alterations both in protein synthesis and phosphorylation (Figs 2 and 3).

The stimulation of protein synthesis by MCPP might correspond to the increase of specific mRNA species. Recently, this was demonstrated in other systems regulated by auxins (Miasod and Got 1984, Hagen and

Guilfoyle 1985, Walker et al. 1985, Theologis 1986). In support of this suggestion is also the fact that this stimulation occurs during the 21–24 h period of maize germination, when newly synthesized mRNAs contribute significantly to support protein synthesis (Sánchez de Jiménez and Aguilar 1984).

The fluorographic analysis of the proteins synthesized, shows strong qualitative modifications caused by the auxin compared to the control (germinating embryos). Specific proteins appear during the auxin treatment (Fig. 2; spots 6–8). These proteins seem to respond to MCPP stimuli similarly to the auxin-controlled proteins observed in soybean hypocotyl (Walker et al. 1985) or in tobacco protoplasts (Meyer et al. 1984a). They fall in the low molecular weight range of 15 to 35 kDa (Fig. 2), similar to those previously reported by other authors (Walker et al. 1985). It has been shown that the type of proteins synthesized under auxin influence is independent of the auxin used, natural or synthetic (Zurfluh and Guilfoyle 1982).

Some authors have found that prolonged exposure of target plant tissues to exogenous auxin might cause adaptation of the tissue to the presence of the auxin (Gougler and Evans 1981). The adaptation seems to occur also in the present case, since the dedifferentiated cells induced are able to grow and divide for many generations in a culture medium in the presence of the auxin (Sánchez de Jiménez et al. 1981).

The above data could be explained if auxin action is related to an increase of protein kinase or a decrease of phosphatase activities, rather than to an overall increase of the specific target proteins serving as kinase substrates. In either case the higher rate of protein phosphorylation could be seen as a consequence of auxin modulation on protein synthesis.

Since many metabolic pathways are regulated by protein phosphorylation, it may be proposed that the primary step of auxin action (probably at the transcriptional level; Guilfoyle 1986, Theologis 1986) is amplified by a cascade system mediated by phosphoproteins that could account for the multiple physiological responses induced by auxins (Moore 1980).

Acknowledgements – This work was supported by CONACYT (National Council for Science and Technology Improvement), grants No. PCAFBNA-005382 and PCAFBNA-021427. The authors are grateful to Dr Joaquín Ortiz Cereceres, Colegio de Postgraduados, Chapingo, for donation of the maize seeds and to Mr Eli Hernández for preparing biological material.

References

- Aguilar, B. & Sánchez de Jiménez, E. 1984. Amino acid pools and protein synthesis. – *Plant Cell Reports* 3: 193–195.
- Baiza, A., Aguilar, B. & Sánchez de Jiménez, E. 1986. Histology and the first cell cycle in maize germination. – *Physiol. Plantarum* 62: 259–264.
- Bonner, W. M. & Laskey, R. A. 1974. A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. – *Eur. J. Biochem.* 46: 83–93.
- Bray, G. A. 1972. A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. – *Anal. Biochem.* 1: 229–235.
- Brooker, J. D., Tomaszewski, M. & Marcus, A. 1978. Protein synthesis, messenger RNAs and early wheat embryo germination. – *Plant Physiol.* 61: 145–149.
- Dominguez, J. L., Fernández, L., Gaunt, J. K. & Sánchez de Jiménez, E. 1977. Control hormonal de la fisiología vegetal, las auxinas en el crecimiento de las plantas. – *Rev. Soc. Quím. Méx.* 21: 298–301.
- Gougler, J. A. & Evans, M. L. 1981. Adaptation of corn roots to exogenously applied auxin. – *Physiol. Plantarum* 51: 394–398.
- Green, C. E., Phillips, R. L. & Kleese, R. A. 1974. Tissue culture of maize (*Zea mays* L.) initiation, maintenance and organic growth factor. – *Crop Sci.* 14: 54–60.
- Guilfoyle, T. J. 1986. Auxin-regulated gene expression in higher plants. – *CRC in Plant Sci.* 4: 237–276.
- Hagen, G. & Guilfoyle, T. J. 1985. Rapid induction of selective transcription by auxins. – *Mol. Cell. Biol.* 5: 1197–1201.
- Jacobsen, J. V. & Higgins, T. J. V. 1978. Posttranscriptional, translational and posttranslational effects of plant hormones. – *In: Phytohormones and Related Compounds* (D. S. Letham, P. B. Goodwin and T. J. V. Higgins, eds), pp. 583–621. Elsevier/North Holland Press, Amsterdam. ISBN 0-444-80053-0.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. – *Nature* 227: 680–685.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. – *J. Biol. Chem.* 193: 265–275.
- Melanson, D. & Trewavas, A. J. 1982. Changes in tissue protein pattern in relation to auxin induction of DNA synthesis. – *Plant Cell Environ.* 5: 53–64.
- Meyer, Y., Aspart, L. & Chartier, Y. 1984a. Auxin-induced regulation of protein synthesis in tobacco mesophyll protoplasts cultivated in vitro. I. Characteristics of auxin-sensitive proteins. – *Plant Physiol.* 75: 1027–1033.
- , Aspart, L. & Chartier, Y. 1984b. Auxin-induced regulation of protein synthesis in tobacco mesophyll protoplasts cultivated in vitro. II. Time course and level of auxin control. – *Plant Physiol.* 75: 1034–1039.
- Mlassod, R. & Giel, C. 1984. An immunological approach to quantitative RNA polymerases in plant cell extracts. – *Planta* 162: 427–433.
- Moore, T. C. 1980. Biochemistry and Physiology of Plant Hormones. – Springer-Verlag, New York, pp. 32–40. ISBN 0-387-00111-8.
- Murashige, T. & Skoog, E. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. – *Physiol. Plantarum* 15: 473–497.
- O'Farrell, P. H. 1975. High resolution two dimensional electrophoresis of protein. – *J. Biol. Chem.* 250: 4007–4021.
- Sánchez de Jiménez, E. & Aguilar, B. 1984. Protein synthesis patterns. Relevance of old and new messenger RNA in germinating maize embryos. – *Plant Physiol.* 75: 231–234.
- & Albores, M. 1979. Auxinas sintéticas en la inducción de callos de maíz. (*Zea mays* L.). – *Agrobiencia* 37: 151–160.
- , Albores, M. & Loyola, V. M. 1981. Effect of 2,4-D analogues on the induction and maintenance of callus in maize tissue culture. – *Ann. Appl. Biol.* 98: 347–355.
- Suzuki, N. & Mizukawa, J. 1985. On the role of stored mRNA in protein synthesis in embryonic axes of germinating *Vigna unguiculata* seeds. – *Plant Physiol.* 79: 327–331.
- Theologis, A. 1986. Rapid gene regulation by auxin. – *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37: 407–438.
- & Ray, P. 1982. Early auxin-regulated polyadenylated mRNA sequences in pea stem tissue. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 418–421.

Walker, J. C., Legocka, J., Edelman, J. & Key, J. L. 1985. An analysis of growth regulator interactions and gene expression during auxin-induced cell elongation using cloned complementary DNAs to auxin-responsive messenger RNAs. - *Plant Physiol.* 77: 847-850.

Yamada, Y. 1977. Tissue culture studies on cereals. - *In Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and*

Organ Culture (J. Reynert and Y. P. S. Bajaj, eds), pp. 144-178. Springer-Verlag, New York. ISBN 0387-07677-8.

Zurfluh, L. & Guilfoyle, T. J. 1982. Auxin and ethylene induced changes in the populations of translatable messenger RNA in elongating sections of soybean hypocotyl. - *Plant Physiol.* 69: 332-337.

Auxin induction of ribosomal protein phosphorylation. Pérez, L. & Sánchez de Jiménez, E. ⁽¹⁾. Depto. de Bioquímica. División de Bioquímica y Farmacia. D.E.Pg. Facultad de Química, UNAM. Ciudad Universitaria. México, D.F. CP 04510 México.

⁽¹⁾ To whom correspondence should be sent.

ABSTRACT

Auxin effect on protein phosphorylation of germinating maize tissues has been investigated. Natural IAA or synthetic MCPP auxin was applied to maize axes and [32 P]-orthophosphate incorporation into soluble, nuclear and ribosomal proteins was recorded.

High stimulation on [32 P]-protein incorporation was found in ribosomal proteins when auxins were present. Purified ribosomal proteins were analysed by two dimensional gel electrophoresis. The kinetics of the [32 P]-label into ribosomal proteins was followed at different pulse lengths and analysed by two-dimensional gel electrophoresis and fluorography. Specific [32 P]-ribosomal protein patterns were found in IAA or MCPP treated tissues.

INTRODUCTION

Protein phosphorylation and de-phosphorylation is recognized as an important mechanism by which the cell activity is regulated in response to a wide variety of external stimuli (5,18,26).

Auxins participate in many physiological processes. At the molecular level it is known that it alters the pattern of synthesized proteins in many different tissues, i.e. soybean (30), maize embryos (17), artichoke tuber (13). However the mechanism of auxin action is at present not known. There is evidence that

auxin action is associated with changes in the phosphorylation status of proteins. Melanson and Trewavas(13) found qualitative alterations in phosphorylated nuclear proteins due to auxin treatment. Recent studies have shown auxin induced changes in protein phosphorylation in oat coleoptiles (29), maize embryos (17) and soybean hypocotyls (28). This process has been shown to be protein specific and seems to be associated with cAMP independent kinases (20,21,28,29).

Phosphorylation of ribosomal proteins has been shown to participate in the formation of mRNA-Rb complex and to influence the speed of mRNA translation (6,27).

Based on the above data, one mechanism that could explain the multiple auxin effects at the molecular level, might be the regulation of the translational machinery by ribosomal protein phosphorylation. The present report is intended to test this possibility.

MATERIALS AND METHODS

Plant material. Seeds of maize (*Zea mays* L. var. Chalqueño) were used as the source of biological material for the work. Embryonic axes were manually cut off from the seeds, surface sterilized using 70 % ethanol (30 s) followed by 5% $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ for 10 minutes.

and rinsed twice with sterile water before the experiments.

Incubation conditions. Sterile axes were incubated on mineral salts of MS medium according to Murashige and Skoog (14) additioned as previously reported (22). For auxin treatment 5 mg l⁻¹ of either IAA (28.5 μM) or MCPP (23.3 μM) were added to the medium and incubation was carried out in darkness at 25°C for 24h.

Reagents. Chemicals including IAA were obtained from Sigma Co., [³²P]-ortophosphate from Amersham.

MCPP (2-methyl-4-chlorophenoxipropionic acid) is a synthetic auxin, analogue of 2,4-D. It was synthesized in the laboratory by Dr. Marta Albores as reported (23). MCPP has been shown to have stronger auxin effect than IAA on several bioassays (7) and supports maize callus growth better than 2,4-D (24). Due to this characteristic, MCPP action was tested in these experiments.

Protein labeling with [³²P]-ortophosphate. Maize embryonic axes (700-900 mg) were incubated on MS medium without or with auxin (IAA or MCPP). A pulse of 11.1 MBq of [³²P]-ortophosphate (37 MBq ml⁻¹, Amersham International) was added during either the last 3h (21 to 24) or 30 min. (23.5 to 24) of the incubation period. After this time, post-ribosomal proteins were isolated from the embryonic axes as previously reported (22). Ribosomal proteins were purified as stated below.

Histone purification was carried out from isolated

nuclei purified through a sucrose cushion (1.7 M) and from that point, Gigot's methodology was followed (8). Protein fractions were precipitated with trichloroacetic acid (TCA: final concentration 10 %, w/v), washed with 5 % w/v TCA and 95 % ethanol, resuspended in water and neutralized with 5 M KOH. Incorporation of [³²P]-phosphate was determined in duplicate in 100 μ l aliquots of the samples by using a liquid scintillation spectrometer (Packard Tri Carb Instruments 3255), following Bray's method (3).

Ribosomal protein purification. After the incubation period, the tissues were washed with 25 ml of grinding buffer containing: 20 mM Tris-HCl (pH=7.8), 5mM MgCl₂, 20 mM KCl, 1 mM PMSF, 1mM NaF, 0.5 % 2-mercaptoethanol, 1 % Triton X-100, 0.25 M sucrose. Samples were frozen with liquid nitrogen and homogenized in grinding buffer (5 ml g⁻¹) with purified sand in a mortar and pestle, precooled at 0°C. The homogenate was filtered through a layer of cheesecloth and after successive steps of centrifugation at 3 000 g and 27 000 g for 10 min, 5 ml of the supernatant was layered onto 2.5 ml of a cushion of grinding buffer containing 0.5 M sucrose plus 0.5 M KCl. Ribosomes were sedimented at 250 000 g for 3.5 h according to Scharf and Nover (25). The ribosomal pellet was resuspended in resuspension buffer (grinding buffer minus sucrose and Triton). The ribosomal protein extraction followed the procedure of Ramjouw and Gordon with minor modification

(19). To the resuspended ribosomes, 0.1 volumes of 1 M $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ was added. Two volumes of glacial acetic acid were added over a period of 1 min and stirring was continued on ice for 60 min. The mixture was centrifuged at 10 000 g for 10 min to pellet the RNA precipitate. The RNA pellet was washed with 0.5 volumes of the original 67 % acetic acid mixture, stirred on ice for 10 min and centrifuged again for 10 min at 10 000 g. The ribosomal proteins of the combined supernatant fluids were dialyzed against 0.5 M acetic acid and lyophilized. The lyophilized pellets were stored at -20°C . Proteins were measured by Lowry's method (11).

Polyacrylamide gel electrophoresis. Polyacrylamide gel elec-trophoresis of ribosomal proteins was carried out according to Madjar et al (12); first dimension electrophoresis in acidic system and second dimension in the presence of SDS. Fluorographs of the gels were obtained by the method of Bonner and Laskey (2).

RESULTS

Incorporation of [^{32}P] into different cell fractions was measured after axes were incubated with [^{32}P]-orthophosphate. Table 1 shows the [^{32}P] distribution found between soluble and ribosomal fractions. Significant amounts of [^{32}P]-proteins were detected suggesting that protein phosphorylation is a

wide spread phenomenon in these tissues. This phenomenon is not a general feature for all proteins, however, since only a few specific proteins were found to be labeled (17). Among them histones (Table 2) and a few of the ribosomal proteins (see below) were identified.

Auxin treatment on axes tissues showed stimulation of the [32 P]-incorporation into specific protein. Either IAA or MCPP caused a substantial increment in the percentage of [32 P]-incorporation in the purified Rb-proteins (Table 2). The purity of the ribosomal protein preparation was tested by two dimensional gel electrophoresis. The characteristic pattern of Rb-protein could be observed when gels were stained with Coomassie blue (Fig.1). The pattern obtained was very similar to the one reported for wheat Rb-proteins (9)

The kinetics of [32 P] incorporation into Rb proteins was investigated, [32 P]-orthophosphate pulses of different lengths were given to the tissues at the end of the incubation period (0.5 or 3 hours pulse between 21 and 24 hours). Two dimensional gel electrophoresis and fluorographic analysis of these proteins are shown in Figure 2A and B. Three main spots [1,2,3] were consistently localized in the same position for the two patterns. A series of small spots were seen only on the half hour pattern (Fig. 2B) and they were not present at all on the 3 h-pattern (Fig.

2A). This, in turn, showed another main spot [4], absent on the 0.5 h pattern. These patterns reproduced very accurately.

These data seems to indicate a rapid turn-over of ^{32}P on some of the phosphorylated proteins and/or an active exchange process between the [^{32}P]-proteins within the ribosome and their de-phosphorylated homologues from a pool of Rb proteins of the cytoplasm.

Analysis of the effect of both natural and synthetic auxins was carried out. Purified Rb-proteins from a 3 h-pulse experiment were analysed by two-dimensional gel electrophoresis and fluorography. The natural auxin gave a [^{32}P]-protein pattern (Fig. 2C) identical to the one observed in the tissues not exposed to exogenous auxin (control, Fig. 2A), except for a small spot at the bottom of the film [5] on the control pattern.

The MCPP pattern, on the other hand, showed important differences. The main spots 1, 2 and 3 were on the same position as on the IAA pattern, but spot 4 was not present at all; instead two other new spots were detected : 6 and 7 (Fig. 2D).

DISCUSSION

It has been well documented that phosphorylation of ribosomal proteins is an important event in regulating

the translation process in animal tissues. Particularly some Rb proteins: S6 and S11 are known to depend on phosphorylation for binding the mRNA and so controlling the speed of protein translation (15,27).

In plants, very little is yet known about the role of protein phosphorylation on this process. In wheat germ, phosphorylation of two ribosomal associated proteins has shown to inhibit protein synthesis, while their de-phosphorylation restores the translational activity (4). Recently, a protein kinase from barley germ has been identified whose level holds an inverse relationship with the protein synthesis rate during germination, and specifically inhibits protein synthesis when added to an *in vitro* translational system (20).

Heat shock proteins in plant tissues have been reported to be associated to Rb-protein phosphorylation (25). The switch in the synthesizing protein pattern observed by this stress, might have a similarity to the protein pattern switch observed by the effect of auxins on different tissues (17,30). This might be so since it has been suggested that cell responses to various types of stresses might share a common molecular mechanism (1).

The present results (Fig. 2) seem to suggest that auxins might regulate the protein translational machinery by phosphorylation of the Rb proteins.

Further work, however, is required to understand fully the physiological meaning of this phenomenon.

A note of warning should be stressed in regard to the differences in phosphorylation patterns found between IAA (natural) vs. MCPP (synthetic) auxin. At the physiological level, natural and synthetic auxins cause similar effects: i.e. bioassays like curvature test, coleoptile elongation, gravitropism, root growth inhibition (16). At the molecular level, however, differences like those indicated above might explain the great variety of target tissues responses found for the different auxins, which at present do not have a clear explanation.

Acknowledgments: We thank M.en C. Raúl Aguilar Caballero for his helpful technical assistance.

LITERATURE CITED

- 1.-Ananthan,J., A L Goldberg., R Voellmy 1986
Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals
and trigger the activation of heat shock genes.
Science 232:522-524
- 2.-Bonner W M,R A Laskey 1974 A film detection
method for tritium-labelled proteins and nucleic acids
in polyacrylamide gels. Eur J Biochem 46:83-93
- 3.-Bray G A 1972 A simple efficient liquid
scintillator for counting aqueous solutions in a liquid
scintillation counter. Anal Biochem 1:229-235
- 4.-Browning K S, T F J Yan, S J Lauer, L A Aquino,
M Tao, J M Ravel 1985 Phosphorylation of wheat germ
initiation factors and ribosomal proteins. Plant
Physiol 77:370-373
- 5.-Cohen P 1985 The role of protein phosphorylation
in the hormonal control of enzyme activity. Eur J
Biochem 151:429-448
- 6.-Duncan R,E H Mc Conkey 1982 Preferential
utilization of phosphorylated 40-S ribosomal subunits
during initiation complex formation. Eur J Biochem
123:535-538
- 7.-Fawcett,C W, J Osborne, R L Wain, D Walter 1953
Side-chain structure in relation to growth regulating
activity in the aryloxyalkyl carboxylic acids. Ann Appl
Biol 40: 231-243
- 8.-Langenbuch J, G Philipps, C Gigot 1983

Fractionation and characterization of histones from barley. *Plant Mol Biol* 2:207-220

9.-Legocki A.B., C.J. Madrzak, D Przybyl, M Sikorski, U Szubiak 1980 Functional characterization of some ribosomal proteins from wheat germ. In C J Leaver, ed, *Genome Organization and Expression in Plants*, Plenum Press, New York, pp 195-201

10.-Libbenga K R, H J van Telgen, A M Mennes, P C G van der Linde, E J van der Zaal 1986 Characterization and function analysis of a high-affinity cytoplasmic auxin-binding protein *UCLA Symposium* 1986

11.-Lowry O H, N J Rosebrough, A L Farr, R J Randall 1951 Protein measurements with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275

12.-Madjar J J, S Michel, A J Cozzone, J-P Reboud 1979 A method to identify individual proteins in four different two-dimensional gel electrophoresis systems: Application to *Escherichia coli* ribosomal proteins. *Anal Biochem* 92:174-182

13.-Melanson D, A J Trewavas 1982 Changes in tissue protein pattern in relation to auxin induction of DNA synthesis. *Plant and Cell Environ* 5:53-64

14.-Murashige T, F Skoog 1962 A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiol Plantarum* 15: 473-497

15.-Nielsen P J, G Thomas, J L Maller 1982 Increased phosphorylation of ribosomal protein S6 during meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *Proc Natl*

Acad Sci USA 79:2937-2941

16.-Nissen P 1985 Dose responses of auxins. *Physiol Plant* 65:357-374

17.-Pérez L, R Aguilar, E Sánchez de Jiménez 1987 Effect of an exogenous auxin on maize tissues. Alteration of protein synthesis and phosphorylation. *Physiol. Plantarum* 69:517-522

18.-Poovaiah B W, A S N Reddy, J J Mc Fadden 1987 Calcium messenger system: Role of protein phosphorylation and inositol bisphospholipids. *Physiol Plant* 69:569-573

19.-Ramjoe H P, J Gordon 1977 Evolutionary microdivergence of chicken and rat liver ribosomal proteins. *J Biol Chem* 252:9065-9070

20.-Reddy S, A Raina, S Gunnery, A Datta 1987 Regulation of protein synthesis in plant embryo by protein phosphorylation. *Plant Physiol* 83:988-993

21.-Saluja D, A Bansal, R C Sachar 1987 Regulation of protein kinase through *de novo* enzyme synthesis in germinating embryos of wheat: enzyme purification and its autophosphorylation. *Plant Science* 50:37-48

22.-Sánchez de Jiménez E, R Aguilar 1984 Protein synthesis patterns. Relevance of old and new messenger RNA in germinating maize embryos. *Plant Physiol* 75:231-234

23.-Sánchez de Jiménez E, M Albores 1979 Auxinas sintéticas en la inducción de callos de maíz (*Zea mays* L.) *Agrociencia* 37:151-160

24-Sanchez de Jiménez E, M Albores, V Loyola-Vargas
1981 Effect of 2,4-D-analogues on the induction and
maintenance of callus in maize tissue culture. *Ann Appl
Biol* 98:347-353

25-Scharf K-D, L Nover 1982 Heat shock-induced
alterations of ribosomal protein phosphorylation in
plant cell cultures. *Cell* 30: 427-437

26-Sibley D R, J L Benovic, M G Caron, R J
Lefkowitz 1987 Regulation of transmembrane signaling by
receptor phosphorylation. *Cell* 48:913-922

27-Traugh J, 1981 Regulation of protein synthesis by
phosphorylation In J Litwack ed, *Biochemical Action of
Hormones*, Vol 8. Academic Press, New York pp 167-208

28-Varnold R, D J Morré 1985 Phosphorylation of
membrane-located proteins of soybean hypocotyl:
inhibition by calcium in the presence of
2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Bot Gaz* 146:315-319

29-Veluthambi K, B W Poovaiah 1986 *In vitro* and *in
vivo* protein phosphorylation in *Avena sativa* L.
coleoptiles. Effect of Ca-calmodulin antagonists and
auxins *Plant Physiol* 81:836-841

30-Zurfluh L L, T J Guilfoyle 1980 Auxin-induced
changes in the patterns of protein synthesis in soybean
hypocotyl. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:357-361

TABLE 1
DISTRIBUTION OF ^{32}P -INCORPORATION INTO SOLUBLE AND
RIBOSOMAL FRACTIONS

One g of maize embryonic axes were incubated on MS medium in the presence of [^{32}P]-orthophosphate. Each protein fraction was precipitated with TCA 10%, resuspended and counted.

| Fraction | [^{32}P]-incorporation (cpm mg $^{-1}$) |
|-----------|---|
| Soluble | 530 146 |
| Ribosomal | 43 250 |

TABLE 2

[³²P]-INCORPORATION INTO SEVERAL PROTEIN FRACTIONS

One g of maize embryonic axes were incubated on MS medium with or without auxin in the presence of ³²P-orthophosphate. Each protein fraction was precipitated with TCA 10% resuspended and counted.

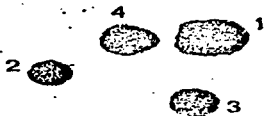
| Purified proteins | ³² P-incorporation (cpm mg ⁻¹) | | |
|--------------------|---|------------------------------|------------------------------|
| | Control | +MCP (5 mg l ⁻¹) | +IAA (5 mg l ⁻¹) |
| Nuclei histones | 10 607 | 6 724 | 10 556 |
| Ribosomal proteins | 34 713 | 64 809 | 59 337 |

Figure 1.-Two-dimensional pattern of maize ribosomal proteins. Ribosomal proteins were isolated as indicated in methods and separated according to Madjar's procedure (12). One hundred μg ribosomal proteins were applied. First-dimension acidic system. migration is carried towards the cathode at 150 V (constant voltage) for 5 h (current less than 1 mA/gel). Second-dimension in the presence of SDS, 12.5%(w/v) acrylamide, 0.25% methylen bisacrylamide.

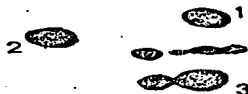
Figure 2.-Fluorogram of ribosomal [^{32}P]-labeled proteins. Two dimensional gel electrophoresis was carried out following Madjar's procedure (acid-SDS). Three hours [^{32}P]-ortophosphate pulse was given between 21 to 21 h (A,C,D) or 30 min pulse was given between 23.5 to 24 h (B). (A)=control long pulse, (B)=control short pulse, (C)=+IAA, (D)=+MCP. P.



+ →



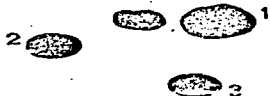
A
→ ↓ + →



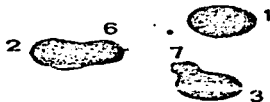
B
→ ↓ •



+ →



C
→ ↓ + →



D
→ ↓

+

+

V. DISCUSION

Los resultados de la literatura respecto al mecanismo de acción de las auxinas en distintos modelos (efectos en la pared celular, elongación celular y división celular) y los provenientes de este trabajo (desdiferenciación celular) indican que a nivel molecular estas respuestas tienen características comunes, como son el control de la síntesis del RNA y las proteínas, así como de la fosforilación de proteínas (41,57,149,155).

El grupo de Guilfoyle encontró en soya que el efecto de las auxinas en la regulación de la síntesis de proteínas es independiente de la auxina usada, natural o sintética (43). Sin embargo, su estrategia experimental no permite una resolución suficiente de todas las proteínas presentes para asegurar que no existen cambios menores en esos patrones.

La aplicación de auxina exógena en ejes embrionarios de maíz induce una alteración tanto en el patrón de proteínas sintetizadas como en su estado de fosforilación (artículo I, figuras 2 y 4). Sin embargo, la auxina natural (AIA) y la sintética (MCP) tienen un efecto diferencial en la fosforilación de las proteínas de la fracción ribosomal (artículo II, figuras 6B y 6C).

Las diferencias en el patrón de fosforilación de estas proteínas puede interpretarse como cambios de proteínas fosforilables o bien como una sobrefosforilación de las mismas proteínas, lo que ocasionaría un corrimiento en su movilidad electroforética (Figura 6B, con MCP). Estas diferencias a nivel molecular podrían correlacionarse con las distintas eficiencias de estos compuestos en la inducción de la formación de callos. Al respecto se sabe por estudios previos que el MCP es más eficiente que el AIA en la inducción y mantenimiento de callos de maíz,

además se ha observado que el efecto de AIA es reversible en tanto que el de auxinas sintéticas no lo es (6,21,22,154). Una posible explicación a estas diferencias pudiera ser la mayor velocidad de degradación del AIA respecto a las auxinas sintéticas que implicaría una acción más prolongada de éstas en los tejidos; sin embargo, la aplicación de AIA en concentraciones mayores o en forma continua, en lugar de pulso, no iguala el efecto fisiológico del MCPP (datos no presentados). Otra explicación sería que estas auxinas tuvieran distintas afinidades por el receptor, resultados previos apoyan esta posibilidad (156).

En los últimos años se ha reportado que las auxinas pueden controlar los niveles de diversos RNA mensajeros específicos y algunos autores proponen que las alteraciones encontradas en los patrones de proteínas sintetizadas bajo efecto de auxinas, se deben a estos cambios (4,5). Sin embargo, esta alternativa parecería poco probable, ya que el patrón de proteínas sintetizadas en presencia de auxinas presenta múltiples cambios (más de treinta) en el sistema de maíz (artículo II, figura 6), en tanto que el número de RNA mensajeros modulados por auxinas es de un orden de magnitud más pequeño. Más aún a la fecha solo se han analizado unas cuantas clonas (4,5,157) correspondientes a unos cuantos RNA mensajeros por lo que no se puede establecer una correlación completa entre la regulación en los niveles de transcritos y los niveles de proteínas. Por lo tanto la información con que se cuenta a la fecha permite sugerir que la acción de las auxinas se ejerce tanto a nivel transcripcional como traduccional.

En este trabajo se presentan evidencias que sugieren que el control de las auxinas en la regulación de la síntesis de proteínas podría ejercerse a través de la fosforilación de la maquinaria de

síntesis, ya que las auxinas inducen un incremento considerable en la fosforilación de las proteínas ribosomales (artículo II Tabla 3). En reportes previos de la literatura se indica que en plantas las proteínas ribosomales se fosforilan en respuesta a distintos estímulos externos, tales como el shock de calor (137) y la aplicación exógena de citocinina y ácido abscísico (138). Más aún, también se ha correlacionado la fosforilación de la proteína S6 con un aumento en los niveles de polisomas y un aumento en la velocidad de síntesis de proteínas (138), así como que el estado de fosforilación de otros elementos de la maquinaria de traducción (136,153,158) modulan la eficiencia de la misma. (138).

En tejidos animales existe mayor información respecto a que la fosforilación/defosforilación de la maquinaria de síntesis de proteínas modula la velocidad de traducción (151,152).

Es importante resaltar que el incremento en la fosforilación de las proteínas ribosomales encontrado en este trabajo por aplicación de auxinas pudiera deberse a un aumento en la(s) proteína(s) cinasa(s) encargada(s) de dicha fosforilación y/o a que aumenten los sustratos respectivos (proteínas ribosomales). Que éstas son explicaciones plausibles se comprueba por el hecho de que el grupo de Key (62,63) ha identificado entre los RNA mensajeros que se regulan por auxinas los de diversas proteínas ribosomales. Más aún se ha reportado la presencia de cinasas sintetizadas *de novo* durante la germinación de trigo (158).

La relevancia que podría tener el estado de fosforilación de las proteínas ribosomales en la eficiencia y fidelidad de la maquinaria de traducción podría inferirse de las diferencias en los valores de K_m encontrados para los ribosomas tratados con auxinas en relación a los de tejido control (figura 12, tabla 5). Estos

resultados sugieren cambios en la estructura del complejo de síntesis de proteínas, los que reflejan una selectividad diferencial de los ribosomas hacia los RNA mensajeros endógenos presentes en los tejidos y/o cambios en la velocidad de lectura de dichos mensajes. Para comprobar esta sugerencia se requiere hacer estudios acerca de la afinidad y fidelidad de traducción de estos ribosomas por los RNA mensajeros endógenos.

Por otra parte los resultados de la frecuencia de error en la lectura del mensajero sintético poli-U por ribosomas en diferente estado de fosforilación (tabla 6) apoyan también este argumento, ya que se encontró que los ribosomas provenientes de tejidos tratados con auxinas muestran una frecuencia de error mayor a la de los ribosomas del tejido control. La relevancia fisiológica de esta regulación requiere de estudios posteriores , ya que los resultados aquí presentados sobre este aspecto son todavía preliminares.

Los resultados del presente trabajo apoyan la idea de que un aspecto importante de la acción de auxinas es la fosforilación de proteínas, como mecanismo de regulación de diversos procesos. Si el proceso estudiado se regula tanto a nivel transcripcional (incremento en una o varias cinasas de proteínas ribosomales y/o incremento en las proteínas ribosomales susceptibles de fosforilación) como traduccional (como resultado de la modulación por el estado de fosforilación de los ribosomas), sería fácil explicar las múltiples alteraciones observadas en los patrones de proteínas sintetizadas y a su vez la multiplicidad de efectos fisiológicos observados en los diversos tejidos "blanco" de auxinas. Con base en lo anterior se propone que las auxinas podrían funcionar como un sistema de acción en cascada.

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Moore, T.C. (1979) Auxins. En: Biochemistry and Physiology of Plant Hormones. Cap. 2. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York pp 32-89.
- 2.-Zurfluh, L.L. & Guilfoyle T.J. (1980) Auxin-induced changes in the patterns of protein synthesis in soybean hypocotyl. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77 357-361.
- 3.-Schuster, A. & Davies, E. (1983) Ribonucleic acid and protein metabolism in pea epicotyls. III Response to auxin in aged tissues. Plant Physiol. 73 822-831.
- 4.-Theologis, A. (1986) Rapid gene regulation by auxin. Ann. Rev. Plant Physiol. 37 407-438.
- 5.-Guilfoyle, T.J. (1986) Auxin-regulated gene expression in higher plants. CRC Critical Reviews in Plant Sciences 4 247-276.
- 6.-Sánchez de Jiménez, E., Albores, M. & Loyola, V.M. (1981) Effect of 2,4-D analogues on the induction and maintenance of callus in maize tissue culture. Ann. Appl. Biol. 98 347-353.
- 7.-Ray, P.M., Dohrman, U. & Hertel, R. (1977) Specificity of auxin-binding sites during the growth of batch cultured tobacco cells Planta 152 415-419.
- 8.-Vreugdenhil, D., Burgers, A., Harkers, P.A.A. & Libbenga, K.R. (1979) Modulation of the number of membrane-bound auxin binding sites during the growth of batch cultured tobacco cells. Planta 152 415-419.
- 9.-Cohen, P. (1985) The role of protein phosphorylation in the hormonal control of enzyme activity. Eur. J. Biochem. 151 429-448.
- 10.-Poovaiah, B.W., Reddy, A.S.N. & Mc Fadden, J.J. (1987) Calcium messenger system: Role of protein phosphorylation and inositol-bisphospholipids. Physiol. Plantarum 69 569-573.

11.-Melanson,D., & Trewavas,A.J. (1982) Changes in tissue protein pattern in relation to auxin induction of DNA synthesis. *Plant and Cell Environ.* 5 53-64.

12.-Cheung,W.Y.(1980) Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science* 207 19-27.

13.-Moore,T.C.(1979) Introduction En *Biochemistry and Physiology of Plant Hormones*. Cap.1.Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. New York pp.1-31.

14.-Stoddart,J.L. & Venis,M.A. (1980) Molecular and subcellular aspects of hormone action.Cap.5 En *Hormonal Regulation of Development*.Encyclopedia of Plant Physiology.New Series Vol.9 (Mc Millan,J.ed.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York pp 445-460.

15.-Goodwin,P.B. (1978) Phytohormones on growth and development of the vegetative plant. En *Phytohormones and Related Compounds*. A Comprehensive Treatise, Vol. 2 Cap. 2. (Letham,D.S., Goodwin,P.B. & Higgins,T.J.V. eds.) Elsevier/North Holland Biomedical Press New York pp60.

16.-Zeroni,M. & Hall,M.A. (1980) Molecular effects of hormone treatment on tissue. En *Hormonal Regulation of Development*. Encyclopedia of Plant Physiology.New Series Vol.9 Cap.6 (Mac Millan,J. ed) Springer-Vrlag, Berlin, Heidelberg, New York pp 480-568.

17.-Schneider,E. & Wightman,F. (1978) Auxins. En *Phytohormones and Related Compounds* (Letham,D.S., Goodwin,P.B. & Higgins,T.J.V. eds.) Elsevier/North Holland Biomedical Press pp.29-65.

18.-Vanderhoef,L.N. (1981) Auxin regulated elongation. What's new in *Plant Physiol.* 12 25-28.

19.-Jacobsen,J.V. & Higgins,T.J.V. (1978) The influence of phytohormones on replication and transcription. En *Phytohormones and Related Compounds* (Letham,D.S., Goodwin,P.B. & Higgins,T.J.V. eds.) Elsevier/North Holland Biomedical Press pp515-548.

20.-Street,H.E. (1973) *Plant Tissue and Cell Culture*. Botanical Monographs. Vol. 2 Blackwell Scientific Publications, Oxford.

21.-Yamada,Y. (1977) *Tissue Culture Studies on Cereals*. En *Applied and Fundamental Aspects of Plant, Cell, Tissue and Organ Culture* (Reinert,J. & Bajaj, Y.P.S. eds.) Springer-Verlag, New York pp 144-159.

22.-Sánchez de Jiménez,E. & Albores, M. (1979) Auxinas sintéticas en la inducción de callos de maiz (*Zea mays L.*) *Agrociencia* 37 151-160.

23.-Jacobs,M. & Ray,P.M. (1976) Rapid auxin-induced decrease in free space pH and its relationship to auxin-induced growth in maize and pea. *Plant Physiol.* 58 203-209.

24.-Thimman,K.V. (1969) The auxins. En *The Physiology of Plant Growth and Development* (Wilkins,M.B. ed.)Mc Graw-Hill New York pp.2-45.

25.-Vanderhoef,L. (1980) Auxin-regulated cell enlargement: Is there action at the level of gene expression? En *Genome Organization and Expression in Plants* (Leaver, C.J. ed.) Plenum Press, New York, London pp.159-173.

26.-Vanderhoef,L.N., Stahl,C.A., Lu,T.Y.S. (1976) Two elongation responses to auxin respond differently to protein synthesis inhibition. *Plant Physiol.* 58 402-404.

27.-Key,J.L. (1969) Hormones and nucleic acid metabolism. *Ann.*

Rev. Plant Physiol. 20 449-474.

28.-Noodén, L.D. & Thiman, K.V. (1963) Evidence for a requirement for protein synthesis for auxin-induced cell enlargement. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 50 194-200.

29.-Noodén, L.D. & Thiman, K.V. (1966) Action of inhibitors of RNA and protein synthesis on cell enlargement. Plant Physiol. 41 157-164.

30.-Baulcombe, D.C., Giardini, J., Key, J.L. (1980) The effect of auxin on the polyadenylated RNA of soybean hypocotyls. In Genome Organization and Expression in Plants (Leaver, C.J. ed.) Plenum Press New York, London pp175-185.

31.-Guilfoyle, T.J., Lin, C.Y., Chen, Y.M., Nagao, R.T. & Key, J.L. (1975) Enhancement of soybean RNA polymerase I by auxin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 69-72.

32.-Jacobsen, J.V. (1977) Regulation of ribonucleic acid metabolism by plant hormones. Ann. Rev. Plant Physiol. 28 537-564.

33.-Patterson, B.D. & Trewavas, A.J. (1967) Changes in the pattern of protein synthesis induced by 3-indolylacetic acid. Plant Physiol. 43 1081-1086.

34.-Trewavas, A.J. (1968) Effect of IAA on RNA and protein synthesis. Arch. Biochem. Biophys. 123 324-335.

35.-Cleland, R. (1971) Cell wall extension. Ann. Rev. Plant Physiol. 22 197-222.

36.-Cleland, R.E. & Rayle, D.L. (1978) Auxin, H⁺-excretion and cell elongation. Bot. Mag. Tokyo Special Issue 1 125-139.

37.-Cleland, R.E. (1976) Kinetics of hormone-induced H⁺ excretion. Plant Physiol. 58 210-213.

38.-Bates, G.W. & Cleland, R.E. (1980) Protein patterns in the

oat coleoptile as influenced by auxin and by protein turnover. *Planta* 148 429-436.

39.-Zurfluh, L.L. & Guilfoyle, T.J. (1981) Auxin-induced nucleic acid and protein synthesis in the soybean hypocotyl. En *Levels of Genetic Control in Development 39th Symp. Soc. Dev. Biol.* (Subtelny, S. & Abbott, U.K. eds) Alan R. Liss New York pp 83-97.

40.-Zurfluh, L.L. & Guilfoyle, T.J. (1982) Auxin-induced changes in the population of translatable messenger RNA in elongating sections of soybean hypocotyl. *Plant Physiol.* 69, 332-337.

41.-Theologis, A. & Ray, P.M. (1982) Early auxin-regulated polyadenylated mRNA sequences in pea stem tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79 418-421.

42.-Theologis, A. & Ray, P.M. (1982) Changes in messenger RNAs under the influence of auxin. En *Plant Growth Substances 1982* (Wareing, P.F. ed) Academic Press London pp 43-57.

43.-Zurfluh, L.L. & Guilfoyle, T.J. (1982) Auxin induced changes in the population of translatable messenger RNA in elongating maize coleoptile sections. *Planta* 156 525-527.

44.-Zurfluh, L.L. & Guilfoyle, T.J. (1982) Auxin- and ethylene-induced changes in the population of translatable messenger RNA in basal sections and intact soybean hypocotyl. *Plant Physiol.* 69 338-340.

45.-Abeles, F.V. (1966) Auxin stimulation of ethylene evolution. *Plant Physiol.* 41 585-589.

46.-Holm, R.E. & Abeles, F.B. (1968) The role of ethylene in 2,4-D induced growth inhibition *Planta* 78 293-297.

47.-Baulcombe, D.C., Kroner, P.A. & Key, J.L. (1981) Auxin and gene regulation. En *Levels of Genetic Control in Development*

(Subtelny, S. and Abbott, U.K. eds) Alan R. Liss New York pp 83-97.

48.-Bevan, M. & Northcote, D.H. (1981) Some rapid effects of synthetic auxins on mRNA levels in cultured plant cells. *Planta* 152 32-35.

49.-Walker, J.C. & Key, J.L. (1982) Isolation of cloned cDNAs to auxin-responsive poly(A⁺)RNAs of elongating soybean hypocotyl. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79 7185-7189.

50.-Hagen, G., Kleinschmidt, A. & Guilfoyle, T.J. (1984) Auxin-regulated gene expression in intact soybean hypocotyl and excised hypocotyl sections. *Planta* 162 53-68.

51.-Theologis, A., Huyhn, T.V. & Davis, R.W. (1985) Rapid induction of specific mRNAs by auxin in pea epicotyl tissue. *J. Mol. Biol.* 183 53-68.

52.-Baulcombe, D.C. & Key, J.L. (1980) Polyadenylated RNA sequences which are reduced in concentration following auxin treatment of soybean hypocotyls. *J. Biol. Chem.* 255 8907-8913.

53.-Hagen, G. & Guilfoyle, T.J. (1985) Rapid induction of selective transcription by auxins. *Mol. Cell. Biol.* 5 1197-1203.

54.-Jacobsen, J.V. & Beach, L.R. (1985) Control of transcription of α -amylase and rRNA genes in barley aleurone protoplasts by gibberellin and abscisic acid. *Nature* 316 275-277.

55.-Mc Night, G.S. & Palmiter, R.D. (1979) Transcriptional regulation of the ovalbumin and conalbumin genes by steroid hormones in chick oviduct. *J. Biol. Chem.* 254 9050-9058.

56.-Swaneck, G.E., Kreuzaler, F., Tsai, M.J., O'Malley, B.W. (1979) Absence of an obligatory lag period in the induction of ovalbumin mRNA by estrogen. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 88 1412-1418.

57.-Walcker, J.C., Legocka, J., Edelman, L. & Key, J.L. (1985) An analysis of growth regulator interactions and gene expression during auxin-induced cell elongation using cloned complementary DNAs to auxin responsive messenger RNAs. *Plant Physiol.* 77 847-850.

58.-Verma, D.P.S., Mac Lachlan, G.A., Byrne, H. & Ewings, D. (1975) Regulation and *in vitro* translation of messenger ribonucleic acid for cellulase from auxin-treated pea epicotyls. *J. Biol. Chem.* 250 1019-1026.

59.-Guilfoyle, T.J. (1980) RNA polymerases and transcription during developmental transitions in soybean. In *Genome Organization and Expression in Plants* (Leaver, C.J. ed) Plenum Press New York 93-104.

60.-Guilfoyle, T.J. (1980) Auxin induced deoxyribonucleic acid dependent ribonucleic acid polymerase activities in mature hypocotyl. *Biochemistry* 19 6112-6118.

61.-Miassod, R. Got, C. & Torreton, J-P. (1984) Immunological estimation of changes in the absolute amounts of nuclear RNA polymerases in strictly auxin-requiring, cultured soybean cells upon addition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Planta* 162 434-439.

62.-Gantt, J.S. & Key, J.L. (1983) Auxin-induced changes in the level of translatable ribosomal protein messenger ribonucleic acids in soybean hypocotyl. *Biochemistry* 22 4131-4139.

63.-Gant, J.S. & Key, J.L. (1985) Coordinate expression of ribosomal protein mRNAs following auxin treatment of soybean hypocotyls. *J. Biol. Chem.* 260 6175-6181.

64.-Rubery, P.H. (1981) Auxin receptors. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32 569-596.

- 65.-Kende,H. & Gardner,G. (1976) Hormone binding in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 27 267-290.
- 66.-Ray,P.M. (1977) Auxin-binding sites of maize coleoptiles are localized on membranes of the endoplasmic reticulum. Plant Physiol. 59 594-599.
- 67.-Venis,M.A. & Batt,S. (1975) Membrane bound receptors for plant hormones. Biochem. Soc. Trans. 3 1148-1151.
- 68.-Venis,M.A. (1977) Hormone-membranes. 4. Membrane-bound auxin receptors. Solubilization and characterization. En Plant Growth Regulation 1976 Lausanne (Pilet,P.E. ed) Springer-Verlag New York pp 27-34.
- 69.-Venis,M.A. (1979) Receptors for plant growth regulators. En Advances in Pesticide Science. Part 3 (Geissbühler,H. ed.) Pergamon Press Oxford pp 487-493.
- 70.-Venis,M.A. (1979) Purification and properties of membrane-bound auxin receptors in corn. En Plant growth substances 1979 Madison (Skoog,F. ed.) Springer-Verlag New York pp 61-70.
- 71.-Venis,M.A. & Watson,P.J. (1978) Naturally occurring modifiers of auxin receptor interaction in corn. Identification as benzoxazolinones. Planta 142 103-107.
- 72.-Morre,D.J. & Cherry,J.H. (1977) Auxin hormone-plasma membrane interactions. En Plant Growth Substances 1976 Lausanne (Pilet,P.E. ed) Springer-Verlag New York pp35-43.
- 73.-Dohrman,U., Hertel,R. & Kowalik,H. (1978) Properties of auxin-binding sites on different subcellular fractions from maize coleoptiles. Planta 140 97-106.
- 74.-Jacobs,M. & Hertel,R. (1978) Auxin-binding to subcellular fractions from *cucurbita* hypocotyls: *in vitro* evidence for an auxin

transport carrier. *Planta* 142 1-10.

75.-Cross, J.W. & Briggs, W.R. (1978) Properties of a solubilized microsomal auxin binding protein from coleoptiles and primary leaves of *Zea mays* L. *Plant Physiol.* 62 152-157.

76.-Vreugdenhil, D., Burgers, A. & Libbenga, K.R. (1979) A particle bound auxin receptor from tobacco pith callus. *Plant Sci. Lett.* 16 115-121.

77.-Bogersa, R.J., Kulescha, Z., Quint, A., Van Vliet, Th. B. & Libbenga, K.R. (1980) The presence of a soluble auxin receptor and the metabolism of 3-indoleacetic acid in tobacco pith explants. *Plant Sci. Lett.* 19 311-317.

78.-Libbenga, K.R. (1978) Hormone receptors in plants. In *Frontiers of Plant Tissue Culture* pp 325-333.

79.-Trewavas, A. (1980) An auxin induces the appearance of auxin-binding activity in artichoke tubers. *Phytochemistry* 19 1303-1308.

80.-Walton, J.D. & Ray, P.M. (1981) Evidence for receptor function of auxin binding sites in maize. *Plant Physiol.* 68 1334-1338.

81.-Poovaiah, B.W. (1982) Strawberry fruit as a model system to study target tissue specificity and the physiological relevance of auxin binding. *Plant Physiol. Suppl.* 69 839.

82.-Narayanan, K.R., Mudge, K.W. & Poovaiah, B.W. (1981) *In vitro* auxin binding to cellular membranes of cucumber fruits. *Plant Physiol.* 67 836-840.

83.-Matthysse, A.G. & Phillips, C. (1969) A protein intermediary in the interaction of a hormone with the genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 63 897-903.

84.-Mondal,R.K. & Biswas,B.B. (1972) RNA stimulated by indoleacetic acid. Nature New Biol. 240.111-114.

85.-Venis,M.A. (1971) Stimulation of RNA transcription from pea and corn DNA by protein retained on Sepharose coupled to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Proc. Natl. Acad. Sci. 68 1824-1827.

86.-Libbenga,K.R., Van Telgen,H.J., Mennes,A.M., Van der Linde.P.C.G. & Van der Zaal,E.J. (1986) Characterization and function analysis of a high-affinity cytoplasmic auxin-binding protein. In: Molecular Biology of Plant Growth Control. Ed. J.E. Fox and M. Jacobs.UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology. New Serie Vol. 44, pp 486. New York Alan R. Liss Inc. New York N.Y..

87.-Brown,E.G. & Newton,R.P. (1981) Cyclic AMP and higher plants. Phytochemistry 20 2453-2463.

88.-Pollard,C.J. (1970) Influence of GA₃ on the incorporation of 8-¹⁴C adenine into adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in barley aleurone layer. Biochim. Biophys. Acta 201 511-517.

89.-Salomon,D. & Mascarenhas,J.P. (1971) Auxin induced synthesis of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in avena coleoptiles. Life Sci. 10 879-885.

90.-Salomon,D. & Mascarenhas,J.P. (1972) The time course of synthesis of cyclic AMP in Avena coleoptiles sections in response to auxin. Plant Physiol. 49 S 30.

91.-Brown,E.G. & Newton,R.P. (1973) Occurrence of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in plant tissues. Phytochemistry 12 2683-2685.

92.-Newton,R.P., Gibbs,N., Moyse,C.D., Wiebers,J.L. & Brown,E.G. (1980) Mass spectrometric identification of adenosine

3':5' cyclic monophosphate isolated from a higher plant tissue. *Phytochemistry* 19 1909-1913.

93.-Giannattasio, M., Mandato, E. & Macchia, V. (1974) Content of 3',5'-cyclic AMP and cyclic AMP phosphodiesterase in dormant and activated tissues of Jerusalem artichoke tubers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 57 365-371.

94.-Hepler, P.K. & Wayne, R.O. (1985) Calcium and plant development. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36 397-439.

95.-Roux, S.J., Wayne, R.O. & Datta, N. (1986) Role of calcium ions in phytochrome response: an update. *Physiol. Plantarum* 66 344-348.

96.-Anderson, J.M. & Cormier, M.J. (1978) Calcium dependent regulation of NAD kinase in higher plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 84 595-602.

97.-Grand, R.J.A., Nairn, A.C. & Perry, S.V. (1980) The preparation of calmodulin from barley (*Hordeum* spp) and Basidiomycete fungi. *Biochem. J.* 185 755-760.

98.-Matsumoto, H., Tanigawa, M. & Yamaya, T. (1983) Calmodulin-like activity associated with chromatin from pea buds. *Plant and Cell Physiol.* 24 593-602.

99.-Van Eldik, L.J., Grossman, A.R., Iverson, D.B. & Watterson, D.M. (1980) Isolation and characterization of calmodulin from spinach leaves and *in vitro* translation mixtures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77 1912-1916.

100.-Watterson, D.M., Iverson, D.B. & Van Eldik, L.J. (1980) Spinach calmodulin: characterization and comparison with vertebrate calmodulins. *Biochemistry* 19 5762-5768.

101.-Marmé, D. & Dieter, P. (1983) Role of Ca²⁺ and calmodulin

in plants. En Calcium and Cell Function Vol. IV (Cheung, W.Y. ed) Academic Press New York pp 263-311.

102.-Schleicher, M., Lukas, T.J. & Watterson, D.M. (1983) Further characterization of calmodulin from barley (*Hordeum vulgare*) Plant Physiol. 73 666-670.

103.-Lukas, T.J., Iverson, D.B., Schleicher, M. & Watterson, D.M. (1984) Structural characterization of a higher plant calmodulin *Spinacea oleracea*. Plant Physiol. 75 788-795.

104.-Williamson, R.E. (1981) Free Ca^{2+} concentration in the cytoplasm: a regulator of plant cell function. What's new in Plant Physiology? 12 45-48.

105.-Gilroy, S., Hughes, W.A. & Trewavas, A.J. (1986) The measurement of intracellular calcium levels in protoplasts from higher plant cells. FEBS Lett. 199 217-221.

106.-Dieter, P. & Marmé, D. (1981) A calmodulin-dependent microsomal ATPase from corn (*Zea mays* L.). FEBS Lett. 125 245-248.

108.-Dieter, P. & Marmé, D. (1980) Calmodulin activation of plant microsomal Ca^{2+} uptake. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77 7311-7314.

109.-Rous, S.J., McEntire, K., Slocum, R.D., Cedel, T.E., Hale, C. (1981) Phytochrome induces photoreversible calcium fluxes in a purified mitochondrial fractions from oats. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78 283-287.

110.-Marmé, D. (1982) The role of calcium in signal transduction of higher plants. En: Plant Growth Substances (Wareing, P.F. ed.) Academic Press New York pp. 419-426.

111.-Kubowicz, B.D., Vanderhoef, L.N., Hanson, J.B. (1982) ATP-dependent calcium transport in plasmalemma preparations from

soybean hypocotyls. *Plant Physiol.* 69 187-191.

112.-Anderson, J.M., Charbonneau, H., Jones, H.P., Mc. Cann, R.O. & Cormier, M.J. (1980) Characterization of the plant nicotinamide adenine dinucleotide kinase activator protein and its identification as calmodulin. *Biochemistry* 19 3113-3120.

113.-Refeno, G., Ranjeva, R. Boudet, A.M. (1982) Modulation of quinate:NAD⁺ oxidoreductase activity through reversible phosphorylation in carrot cell suspensions. *Planta* 154 193-198.

114.-Ranjeva, R., Refeno, G., Boudet, A.M. & Marmé, D. (1983) Activation of plant quinate:NAD⁺ oxidoreductase by Ca²⁺ and calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80 5222-5224.

115.-Obatá, T., Taniguchi, H. & Maruyama, Y. (1983) The effect of calmodulin antagonists on gibberellic acid-induced enzyme secretion in barley aleurone layers. *Ann. Bot.* 52 877-883.

116.-Elliot, D.C. (1983) Inhibition of cytokinin-regulated responses by calmodulin-binding compounds. *Plant Physiol.* 72 215-218.

117.-Elliot, D.C., Batchelor, M., Cassar, R.A. & Marinos, N.G. (1983) Calmodulin-binding drugs affect the response to cytokinin, auxin and gibberellic acid. *Plant Physiol.* 73 219-224.

118.-Oláh, Z., Bérczy, A. & Erdei, L. (1983) Benzylaminopurine induced coupling between calmodulin and Ca-ATPase in wheat root microsomal membranes. *FEBS Lett.* 154 395-398.

119.-Berridge, M.J. & Irvine, R.F. (1984) Inositol trisphosphate a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312 315-321.

120.-Boss, W.F. & Massel, M.O. (1985) Polyphosphoinositides are present in plant tissue culture cells. *Biochem. Biophys. Res.*

Commun. 132 1018-1023.

121.-Heim,S. & Wagner,K.G. (1986) Evidence of phosphorylated phosphatidylinositols in the growth cycle of suspension cultured plant cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 134 1175-1181.

122.-Sandelius,A.S. & Sommarin,M. (1986) Phosphorylation of phosphatidylinositols in isolated plant membranes. FEBS Lett. 201 282-286.

123.-Schäfer,A., Bygrave,F., Matzenauer,S. & Marmé,D. (1985) Identification of a calcium and phospholipid-dependent protein kinase in plant tissue. FEBS Lett. 187 25-28.

124.-Morse,M.J., Crain,R.C. & Satter,R.L. (1986) Phosphatidylinositol turnover in *Samanea pulvini*: a mechanism of phototransduction. Plant Physiol. Suppl. No.486 80 92.

125.-Drobak,B.K. & Ferguson,I.B. (1985) Release of Ca^{2+} from plant hypocotyl microsomes by inositol 1,4,5-trisphosphate. Biochem. Biophys. Res. Commun. 130 1241-1246.

126.-Reddy,A.S.N. & Poovaiah,B.W. (1987) Inositol 1,4,5-trisphosphate induced calcium release from corn coleoptile microsomes. J. Biochem. 101 569-573.

127.-Murray,M.G., Guilfoyle,T.J. & Key,J.L. (1978) Isolation and characterization of a chromatin-associated protein kinase from soybean. Plant Physiol. 61 1023-1030.

128.-Rychlik,W., Kupidowska,E., Novak,E. & Zągoriski,W. (1980) Wheat germ protein kinase affects the translation of brome mosaic virus ribonucleic acid *in vitro*. Biochemistry 19 5249-5255.

129.-Tyan,F.J., Tao, M. (1982) Purification and characterization of a wheat germ protein kinase. J. Biol. Chem. 257 7037-7043.

130.-Hetherington,A. & Trewavas,A. (1982) Calcium dependent protein kinase in pea shoot membranes. FEBS Lett. 145 67-70.

131.-Veluthambi,K. & Poovaiah,B.W. (1984) Calcium promoted protein phosphorylation in plants. Science 223 167-169.

132.-Polya,G.M., Davies,J.R. & Micucci,V. (1983) Properties of a calmodulin-activated Ca^{2+} dependent protein kinase from wheat germ. Biochim. Biophys. Acta 761 1-12.

133.-Varnold,R.L. & Morré,D.J. (1985) Phosphorylation of membrane-located proteins of soybean hypocotyl: inhibition by calcium in the presence of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Bot. Gaz. 146 315-319.

134.-Veluthambi,K. & Poovaiah,B.W. (1986) *In vitro* and *in vivo* protein phosphorylation in *Avena sativa* L. coleoptiles: effect of Ca^{2+} calmodulin antagonists and auxin. Plant Physiol. 81 836-841.

135.-Paliyath,C. & Poovaiah,B.W. (1985) Calcium- and calmodulin-promoted phosphorylation of membrane proteins during senescence in apples. Plant Cell Physiol. 26 977-986.

136.-Browning,K.S., Yan,T.F.J., Lauer,S.J., Aquino,L.A., Tao,M. & Ravel,J.M. (1985) Phosphorylation of wheat germ initiation factors and ribosomal proteins. Plant Physiol. 77 370-373.

137.-Scharf,K.D. & Nover,L. (1982) Heat shock-induced alterations of ribosomal protein phosphorylation in plant cell cultures. Cell 30 427-437.

138.-Yakovleva,L.A. & Kulaeva,O.N. (1987) The effect of phytohormones on phosphorylation of ribosomal proteins in detached pumpkin cotyledons. Biochem. Physiol. Pflanzen. 182 359-365.

139.-Van Loon, L. C., Trewavas,A. & Chapman,K.S.R. (1975) Phosphorylation of chromatin associated proteins in *Lemna* and

Hordeum. Plant Physiol. 55 288-292.

140.-Wong, Y., Cheng, H., Walsh, D.A. & Langarias, J.C. (1986) Phosphorylation of *Avena* phytochrome *in vitro* as a probe of light induced conformational changes. J. Biol. Chem. 261 12089-12097.

141.-Evans, M.L. (1985) The action of auxin on plant cell elongation. CRC Critical Rev. Plant Sci. 2 317-365.

142.-Murashige, T. & Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. Physiol. Plantarum 15 373-397.

143.-Sánchez de Jiménez, E. & Aguilar, R. (1984) Protein synthesis patterns. Relevance of old and new messenger RNA in germinating maize embryos. Plant Physiol. 75 231-234.

144.-Jackson, R.J. & Hunt, T. (1983) Preparation and use of rabbit reticulocyte lysate. Meth. in Enzymol. 96 51-76.

145.-Fehling, E. & Weidner, H. (1980) Temperature characteristics and adaptative potential of wheat germ ribosomes. Plant Physiol. 80 181-186.

146.-Rusala, T. & Kurland, C.G. (1984) Streptomycin preferentially perturbs ribosomal proofreading. Mol. Gen. Genet. 198 100-104.

147.-Mukhopadhyay, A. & Ghosh, B. (1986) Protein synthesis and loss of viability of rice seeds. Effects of polyamines on *in vitro* translation. Physiol. Plantarum 68 441-445.

148.-Mc Murry, L.M. & Algranati, I.D. (1986) Effect of polyamines on translation fidelity *in vivo*. Eur. J. Biochem. 155 383-390.

149.-Meyer, Y., Aspart, L. & Chartier, Y. (1984) Auxin induced regulation of protein synthesis in tobacco mesophyll protoplasts

cultivated *in vitro*. I Characteristics of auxin sensitive proteins. Plant Physiol. 75 1027-1033.

150.-Trewavas,A. (1973) The phosphorylation of ribosomal proteins in *Lemna minor*. Plant Physiol. 51 760-767.

151.-Nielsen,P.J., Thomas,G. & Maller,J.L. (1982) Increased phosphorylation of ribosomal protein S6 during meiotic maturation of *Xenopus oocytes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 2937-2941.

152.-Traugh,J. (1981) Regulation of protein synthesis by phosphorylation. En Biochemical action of hormones. Vol.8 (Litwack,J. ed.) Academic Press New York pp 167-208.

153.-Reddy,S., Raina,A., Gunnery,S. & Datta,A. (1987) Regulation of protein synthesis in plant embryo by protein phosphorylation. Plant Physiol. 83 988-993.

154.-Sánchez de Jiménez,E. & Yañez,L. (1981) Diferenciación celular en cultivos *in vitro* de maíz. En Avances en enseñanza e investigación. Centro de Genética, Colegio de Posgraduados, Chapingo México pp 269-275.

155.-Pérez,L., Aguilar,R. & Sánchez de Jiménez,E. (1987) Effect of an exogenous auxin on maize tissues. Alteration of protein synthesis and phosphorylation. Physiol. Plantarum 69 517-522.

156.-Pérez,L. (1983) Acción de auxinas sintéticas en la germinación de maíz. Caracterización de receptores auxínicos. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas (Bioquímica) Facultad de Química UNAM.

157.-Key,J.L., Kroner,P., Walker,J., Hong,J.C., Ulrich,T.H., Ainley,W.M., Gantt,J.S. & Nagao,R.T.(1986) Auxin-regulated gene expression. En Differential gene expression and plant development .

Proceedings of a Royal Society Discussion Meeting 23-24 april 1986
(Leaver, C.J., Boulter, F.R.S.D. & Flavell, R.B. eds) 427-440.

158.-Saluja, D., Bansal, A. & Sacchar, R.C. (1987) Regulation of
protein kinase through *de novo* enzyme synthesis in germinating
embryos of wheat: enzyme purification and its autophosphorylation.
Plant Sci. 50 37-48.