

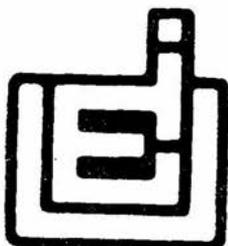


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

**EFFECTO DEL FLOROGLUCINOL EN LA RIZOGENESIS
DE CALLO DE HIPOCOTILO DE FRIJOL MUNGO
(Phaseolus aureus Roxb.)**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
ELIZABETH LEDEZMA MIRANDA
P R E S E N T A



Los Reyes Iztacala, Edo. de México

1989



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIA

A mis padres: Carl y Eduardo

A mis hermanas: Beatriz, Lorena y M^a del Carmen

A mi esposo: Antonio

A mi hijo: Alan

AGRADECIMIENTOS

A mi Director de tesis M. en C. Ignacio Peñalosa C. por su asesoría, interés y confianza mostrada en todo momento.

Al Biol. Antonio E. Cisneros C. por su asesoría y observaciones en la parte estadística.

A la P. de E. Martha Fregoso P. por su amistad y ayuda desinteresadas, brindadas en el desarrollo de este trabajo.

Asimismo, deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron en la realización de este trabajo.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Biorregulación y en la Unidad de Morfología y Función de la - E.N.E.P. Iztacala, U.N.A.M., bajo la dirección del M. en C. Ignacio Peñalosa C.

I N D I C E

	PAG.
Introducción	1
Material y métodos	8
Resultados	14
Discusión	17
Conclusiones	27
Recomendaciones	28
Bibliografía	29

Introducción.

Se dice con frecuencia que la demanda mundial de productos agrícolas se incrementará en los próximos años, tales pronósticos no se alejan de la realidad si se toma en cuenta que hay un creciente aumento de la población y por consecuencia, demanda de productos agrícolas. Esto aunado a las mermas a la agricultura por plagas y enfermedades en países subdesarrollados como México, trae como consecuencia que haya desequilibrios en la economía, tales como: la importación de alimentos básicos; la pérdida de recursos por parte de los agricultores al ser dañados los cultivos; la escasez de alimentos que influye en su encarecimiento y en el deterioro del nivel nutritivo de la población (Ondarza, 1981).

La propagación vegetativa de especies agrícolas, contribuye en gran medida a la domesticación y mejoramiento de éstas, ya que:

1. Tiene el potencial para incrementar el rendimiento en cualquier generación.
2. Por medio de la propagación clonal, se pueden multiplicar y seleccionar caracteres derivados de los genes aditivos y no aditivos.

3. Los clones seleccionados se pueden mantener como bancos de germoplasma.
4. Las interacciones y las covariantes genéticas y ambientales pueden estudiarse eficientemente. De igual forma, se puede estimar el rango de variabilidad debido al componente ambiental.
5. Los clones seleccionados artificialmente, pueden emplearse en plantaciones comerciales.
6. Los progenitores genéticamente uniformes, se pueden multiplicar a gran escala.

(Villalobos, Thorpe y Yeung; 1983)

(El método tradicional de propagación vegetativa es el estacado, éste ha permitido obtener grandes cantidades de material vegetal y en menor tiempo en comparación con la propagación por semilla (Bengochea y Dodds, 1983).)

(La inducción de raíces en explantes de cultivos in vitro, es un punto crucial en cualquier proceso de micro propagación (Gaspar, 1981: citado por Mato, et. al.; 1988).)

(Las investigaciones acerca de los mecanismos impli

cados en la formación de raíces adventicias (secundarias) permitirán superar los problemas de este tipo de propagación, aumentando sus rendimientos.

Hay diversos factores que contribuyen a la formación de raíces adventicias como son: azúcares (Mohinder y Nanda, 1981; Greenwood y Berlyn, 1973), sustancias ni trogenadas (Iwasaki y Weaver, 1977) y una gran cantidad de sinergistas auxínicos (Basu, et. al., 1973; Haissig, 1974; Mohinder y Nanda, op. cit.). Así, en explantes de frijol mungo (Phaseolus aureus Roxb.) el boro y las vitaminas D2 y D3, tuvieron un efecto promotor en la formación de raíces y cuando se aplicaron junto con AIA (ácido indol acético) este efecto fue aún mayor (sinergismo) (Middleton, et. al.; 1978; Jarvis, et. al. 1983, 1984; Jarvis y Yasmin, 1985).

Las auxinas son reconocidas como un factor muy importante en la formación de raíces adventicias (Haissig, 1970). Sin embargo, existen reportes de especies donde aún cuando la aplicación de auxinas sea en dosis óptimas, las estacas no forman raíces o lo hacen muy limitadamente (Bansal y Nanda, 1981). Por lo que se supone que compuestos diferentes de auxinas son nece

sarios para la formación de raíces adventicias, tales como: compuestos fenólicos (Peñalosa, 1980).

Los fenoles son compuestos que aparecen de forma natural en las plantas, están ampliamente distribuidos en el Reino Vegetal, exhibiendo una gran variedad de estructuras: desde compuestos simples de un anillo aromático sencillo, hasta complejas sustancias poliméricas (Wong, 1973).

Se han probado distintos compuestos aplicados exógenamente a varias especies vegetales, mostrando actividad de reguladores del crecimiento vegetal (Demos, et. al.; 1975).

Algunos compuestos fenólicos actúan de forma similar a las auxinas en lo que se refiere a enraizamiento (James y Thurbon, 1981a).

Se cree que éstos pueden ejercer su acción regulando el nivel endógeno de auxinas, ya que la aplicación de éstas induce únicamente la iniciación de raíz en tejidos donde las células están predispuestas a la diferenciación, pero sin causar la diferenciación per se (Haissig, 1974). Una vía por la cual los fenoles pueden ejercer su acción es por medio de la inhibición o aumen

to de la oxidación de AIA (ácido indol acético) por enzimas con actividad de AIA oxidasa, el efecto parece depender de la estructura molecular ya que ciertos ortodifenoles inhiben la actividad de oxidasa, mientras que determinados monofenoles la favorecen (Lee, et. al.; 1982).

Algunos estudios reportan la implicación de compuestos fenólicos (tales como: floroglucinol, hidroquinona, y florodizina así como sus productos de degradación) en sinergismo con auxinas en la promoción de raíces en estacas de manzana M9 y M26 in vitro (James y Thurbon, 1979; James, Nighty y Thurbon, 1980; James y Thurbon, op. cit.).

La importancia del FG (floroglucinol) ha sido especialmente estudiada en estacas de manzano cultivadas in vitro, observándose que éste tiene un efecto promotor en la formación de raíces (Jones y Hatfield, 1976; James y Thurbon, 1981b; Zimmerman, 1984).

En explantes de manzano, más del 90% de tallos enraizaron con una combinación de AIB (ácido indol butírico) y floroglucinol (Welande y Huntrieser, 1981).

En la literatura existen otros estudios que demue

tran que el efecto promotor del floriglucinol no es específico de especies de Malus sp. (manzano). Este efecto se ha observado en híbrido de Rubus (James, 1979) y en el género Prunus (Jones y Hopgood, 1979; Mosella, et al.; 1980, citado por Mato, op. cit.).

Hay evidencias de que el floriglucinol promueve la formación de raíces adventicias en segmentos de hipocotilos de frijol mungo (Phaseolus aureus Roxb.) a la concentración que lo hace el AIA (ácido indol acético), esto durante las primeras fases de diferenciación (Moreno, 1985). Además hubo un aumento en la cantidad de proteínas y compuestos fenólicos, en hipocotilos de Glicine max y callo de Prunus avium, respectivamente (Feuch y Schmid, 1980; Zurfluh y Guilfoyle, 1980 y 1982).

Por lo anterior el presente estudio pretende:

- Establecer si el floriglucinol promueve la rizogénesis en cultivo de callo de frijol mungo, (Phaseolus aureus Roxb.) y contrastar la respuesta obtenida en callo con la que se observa en hipocotilos.
- Determinar si la actividad de oxidasa del ácido indol acético en extractos de callo correlaciona con

la de extractos de hipocotilos.

-Explorar si el efecto de la aplicación de floro-glucinol in vitro a los extractos con actividad de oxidasa del ácido indol acético explican los efectos sobre la capacidad rizogénica.

Material y métodos.

1. Obtención y desinfestación del material vegetativo

Se utilizaron semillas de frijol mungo (Phaseolus aureus Roxb.) las cuales se obtuvieron de fuente comercial, éstas se desinfestaron con alcohol al 70% por 30 segundos e hipoclorito de Sodio al 20% por 20 minutos, se lavaron con agua corriente 24 horas y fueron germinadas a 27 °C en la oscuridad.

2. Bioensayo

Pasados 7 días, las plántulas se lavaron con agua destilada y se decapitaron asépticamente 1 cm. por debajo de los cotiledones y 1 cm. arriba de la primera raíz. Los hipocotilos (de 7 cm. de longitud) se utilizaron para los diferentes tratamientos.

Los tratamientos consistieron en FG (floroglucinol 1×10^{-3} y $1 \times 10^{-5} M$ (en solución acuosa) y el control (agua destilada). Los hipocotilos se pusieron en tubos de vidrio 1x10 cm., 5 hipocotilos por tubo con 4 ml. de solución, cubriendo de 4 a 4.5 cm. de su zona basal.

Se utilizaron 40 hipocotilos por tratamiento; des-

pués de 24 horas con el tratamiento, los hipocotilos se lavaron y mantuvieron con agua destilada por 7 días, pasados los cuales se contaron las raíces (Modificado de Hess, 1961).

Posterior al conteó de raíces, se procedió a realizar el extracto por tratamiento para medir la actividad de la oxidasa del AIA (ácido indol acético).

3. Medio de cultivo

Se utilizaron las sales minerales del medio Murashige y Skoog (1962) complementado con los componentes orgánicos del medio modificado de White (citados por Boll y Lian, 1970) y diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento (auxinas, citocininas) en arreglo factorial con el fin de determinar la mejor combinación para la formación de callo.

El medio de cultivo se distribuyó en frascos de vidrio de 125ml. (Gerber) en cantidades de 20 ml., se taparon perfectamente con papel aluminio y se esterilizó en autoclave a 1.05 kg./cm² de presión por 20 minutos.

4. Desinfestación del material vegetativo

Las plántulas de 7 días, se lavaron con agua desti-

CUADRO 1

SALES MINERALES DE MURASHIGE Y SKOOG,
UTILIZADAS EN LA INDUCCION DE CALLO DE
HIPOCOTILO DE FRIJOL MUNGO

(Phaseolus aureus Roxb.)

No.	REACTIVOS	(mg / l)
1	NITRATOS	
	NH ₄ NO ₃	1, 650
	KNO ₃	1, 900
2	SULFATOS	
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
	MnSO ₄ · 3H ₂ O	22.3
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6
	CuSO ₄ · 6H ₂ O	0.025
3	HALOGENOS	
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	440
	KI	0.83
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025
4	PO₄ BO₃ MoO₄	
	KH ₂ PO ₄	170
	H ₃ BO ₃	6.2
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25
5	Na Fe EDTA	
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8
	Na ₂ EDTA	37.3

CUADRO 2

COMPONENTES ORGANICOS DE WHITE,
UTILIZADOS EN LA INDUCCION DE —
CALLO DE HIPOCOTILO DE FRIJOL
MUNGO.

(Phaseolus aureus Roxb.)

Mio inositol	200 (mg/l)
Glicina	6
Acido L-glutámico	50
Acido L-aspártico	50
Riboflavina	0.1
Tiamina HCl	1
Acido nicotínico	0.4
Piridoxal HCl	1
Cloridrato de colina	1
Pantotenato de calcio	1
Nicotinamida	1
Glutamina (L)	100
Urea	50
Asparagina (L)	25
Adenina SO ₄	5
Vitamina E ₁₂	0.0015
Acido fólico	1
Agua de coco	150 ml/l
Agar-agar	8,000
Sacarosa	20,000

lada y se decapitaron asépticamente 1 cm. por debajo de los cotiledones y 1 cm. arriba de la primera raíz, se llevaron al área de flujo laminar para su desinfestación. Los hipocotilos se colocaron en una caja de Petri estéril, la cual contenía una solución de hipoclorito de Sodio al 4% durante 15 minutos; transcurrido ese tiempo se enjuagaron con agua destilada estéril para para quitar residuos que pudieran quedar en el tejido; posteriormente se colocaron en alcohol etílico al 70% durante 1 minuto, se hicieron 3 lavados con agua estéril y se escurrieron perfectamente.

5. Corte y siembra del material vegetativo.

Concluida la desinfestación se procedió a fragmentar el tejido en segmentos de 1 cm. aproximadamente para ser depositados en los frascos con medio de cultivo, se sembraron 2 segmentos por frasco. Posterior al corte y siembra de cada segmento, las tijeras y pinzas utilizadas se sumergieron en alcohol y se flamearon. Los frascos se mantuvieron en laboratorio a 26 ± 6 °C, a un foto período de 10 horas.

6. Tratamiento de los callos

Los tratamientos consistieron en medio de cultivo modificado; sustituyendo el agua de coco por 150 ml. de agua destilada (Dix y Van Staden, 1982), complementado con AIA (ácido indol acético) y FG (floroglucinol) a las siguientes concentraciones:

AIA	$1 \times 10^{-6} M$
	$5 \times 10^{-6} M$
	$1 \times 10^{-5} M$
FG	$1 \times 10^{-5} M$
	$1 \times 10^{-4} M$
	$1 \times 10^{-3} M$
	$1 \times 10^{-2} M$

El lote control consistió en callos en medio nutritivo sin reguladores. La unidad experimental consistió de un callo por frasco, y se tuvieron 10 repeticiones por tratamiento

7. Actividad de la oxidasa del AIA

Extracción. 20 g. de callo por tratamiento y 20 g. de hipocotilos de frijol mungo (Phaseolus aureus Roxb.), se homogenizan por separado en un mortero con 40 ml. de

medio de extracción que contenía una concentración final de: manitol 0.3M; cisteína 4mM; PVP insoluble 0.1%; albúmina de suero de bovino 0.9%; EGTA 2mM.

El homogenizado se filtró en gasa (8 capas), ajustando el pH a 7.4 con trisma base y HCl, se centrifugó a 1478 gs. por 10 minutos, se descartó el precipitado y el sobrenadante se centrifugó a 12062 gs. por 10 minutos (Donner, 1967).

Se tomó el sobrenadante y se utilizó el mismo día para valorar la actividad de la oxidasa del AIA en el extracto.

Se prepararon 6 tubos por duplicado por extracto de los hipocotilos tratados (como se indica en el no. 2 de Material y Métodos) con FG $1 \times 10^{-5}M$ (HD), $1 \times 10^{-3}M$ (HC) y agua destilada (HE). Adicionalmente, se realizó un extracto de tallo y otro de hipocotilos obtenidos de un germinado de 7 días (HA).

No.	FG	MnCl ₂	Extracto	AIA	DCF*	Buffer fosfato
Tubo	10mM	.05mM		.1mg/ml	.05mM	50mM pH 5.7
1.	0.01(m)	0.05(ml)	0.2 (ml)	--	--	0.74
2	0.01	0.05	0.2	0.2	--	0.54
3	0.01	0.05	0.2**	0.2	--	0.54
4	--	0.05	0.2	--	--	0.75
5	--	0.05	0.2	0.2	--	0.55
6	--	0.05	0.2**	0.2	--	0.55
7	--	0.05	0.2	0.2	0.05	0.50
8	0.01	0.05	0.2	0.2	0.05	0.49

*2,4diclorofenol

** inactivados (se agregan 2ml. de reactivo de Salkowski, antes de incubar)

Los tubos se incubaron por 20 minutos a 30 °C con agitación, transcurrido este tiempo se agregaron 2 ml. de reactivo de Salkowski por tubo. Después de 15 minutos se midió la absorbancia de las muestras en espectrofotómetro SP 8-100 Pye unicam a 530 nm. .

Composición del reactivo de Salkowski:

1ml. FeCl₃ 3% P/V se llevó a 50ml. con HCl al 35%.

(Talwar, et. al.; 1985)

Resultados.

El medio de cultivo que contiene las proporciones adecuadas de auxina/citocinina para inducir la formación de callo es de 0.5mg/l de 6 furfurilaminopurina y 2 mg/l de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (medio de cultivo C2, ver cuadro 3). El callo se identificó como pequeños agregados de células no organizadas y se formó en un lapso de 20 días.

El tratamiento de los callos con AIA (ácido indol acético) $1 \times 10^{-6} \text{M}$, $5 \times 10^{-6} \text{M}$, $1 \times 10^{-5} \text{M}$; y FG (floroglucinol) $1 \times 10^{-5} \text{M}$, $1 \times 10^{-4} \text{M}$, $1 \times 10^{-3} \text{M}$, $1 \times 10^{-2} \text{M}$ no permitió la formación de raíces en ningún caso.

Por cada 0.2 ml de extracto se observó un incremento mayor al doble de la actividad de oxidasa del AIA en callo, y mayor a 5 veces por cada mg de proteína con respecto a los extractos de hipocotilo (ver figuras 1, 2 y 3).

No se encontró relación entre la actividad de oxidasa del AIA y la presencia o ausencia de DCF (2,4 diclorofenol) (el cual es un cofactor de la actividad de la oxidasa del AIA de la peroxidasa de rábano, Lee; 1977) (ver figura 1).

No se encontraron diferencias al medir la actividad de la oxidasa del AIA en presencia ó ausencia de FG in vitro (figuras 1 y 2).

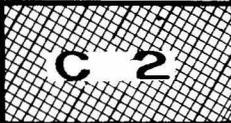
La interpretacion de los resultados mencionados con respecto a la actividad de la oxidasa del AIA se corroboró por medio de un análisis de varianza trifactorial (Reyes, 1982), encontrándose que hubo diferencias significativas con una $P < .01$ entre la actividad de la oxidasa del AIA de los extractos de callo e hipocotilo; los otros dos factores (FG y DCF) así como las posibles interacciones resultaron no significativas con una $P > .01$.

(Se reprodujo el experimento realizado por Moreno (op. cit.) y se corroboró que efectivamente el FG 1×10^{-3} y 1×10^{-5} M promueve la formación de raíces en hipocotilos de frijol mungo (Phaseolus aureus Roxb.). Cuando los resultados del número de raíces formadas por tratamiento se sometieron a un análisis de varianza (Daniel, 1982), con una $P < .01$, se encontraron diferencias significativas entre el lote control (agua destilada), FG 1×10^{-3} M y FG 1×10^{-5} M. Al aplicar una comparación de me-

días (DNSE de Tukey) (Durán, et. al.; 1988), se encontró que el FG $1 \times 10^{-3} \text{M}$ tuvo un mayor efecto que FG $1 \times 10^{-5} \text{M}$ en la promoción de raíces de hipocotilo y los nodos, fueron diferentes con respecto al control.)

(No hubo diferencias en la actividad de la oxidasa del AIA entre los extractos de hipocotilos tratados con FG $1 \times 10^{-5} \text{M}$ (HD), FG $1 \times 10^{-3} \text{M}$ (HC), hipocotilos en agua - destilada (HB) y el extracto de hipocotilos de germinados de 7 días (HA) (Figura 4).)

CUADRO 3

AUXINA (a) (ac. 2,4 diclorofenolacético) (b) (6 furililaminopiridina) CITOCININA	0 1 (1 mg/l)	0 2 (2 mg/l)	0 3 (3 mg/l)
b 1 (0.5 mg/l)	C 1	 C 2	C 3
b 2 (1 mg/l)	C 4	C 5	C 6
b 3 (1.5 mg/l)	C 7	C 8	C 9

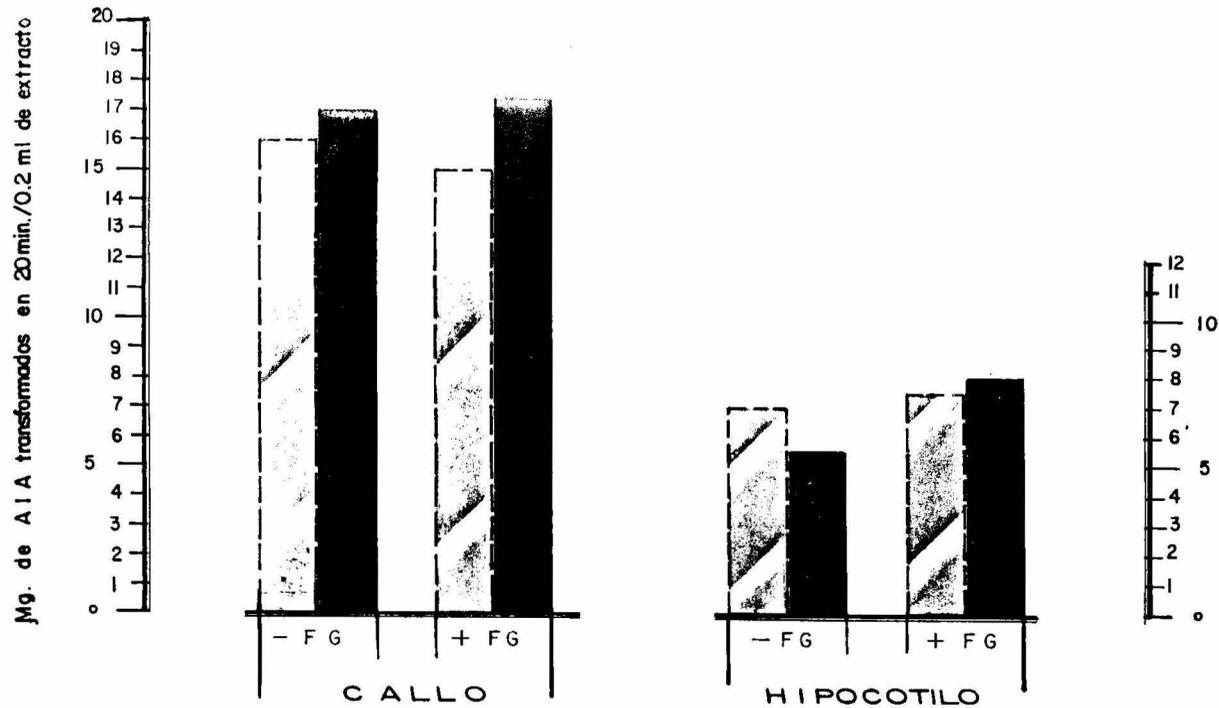


MEDIO DE CULTIVO ADECUADO PARA INDUCIR LA FORMACION DE CALLO DE HIPOCOTILO DE FRIJOL MUNGO (*Phaseolus aureus* Roxb.)

Ci = COMBINACION DE a y b.

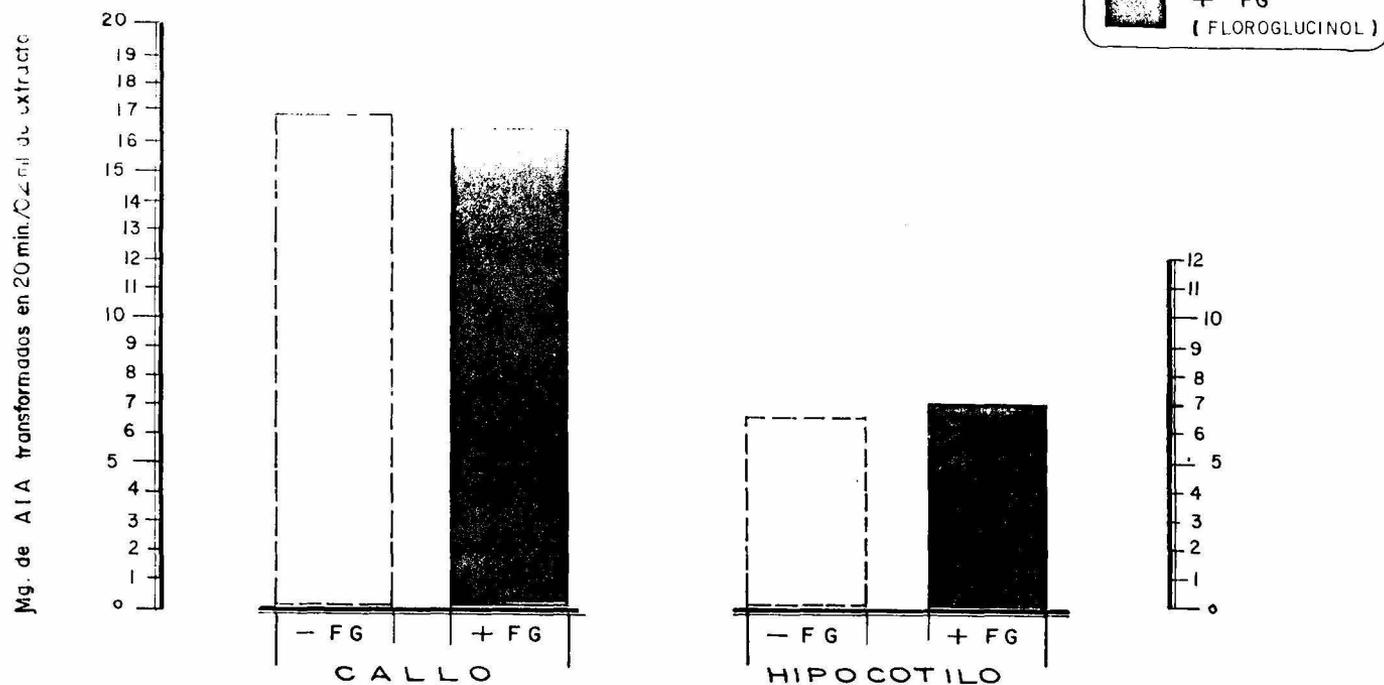
MEDIO DE CULTIVO COMPLEMENTADO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL.

FIGURA 1



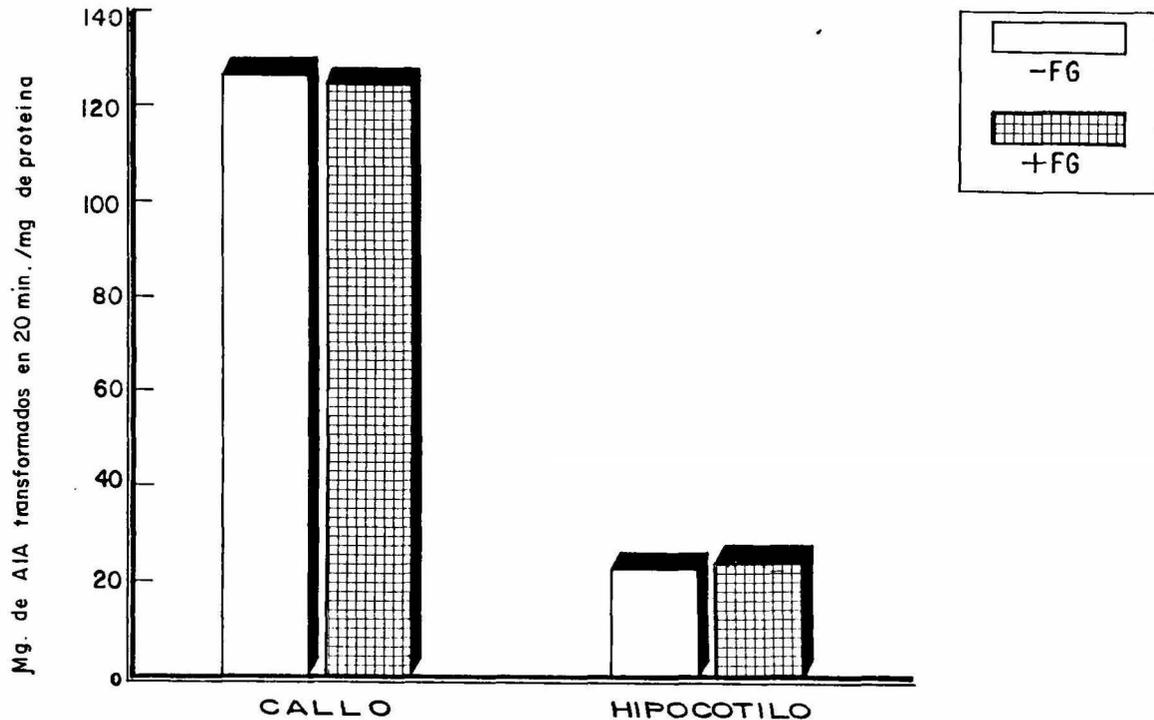
ACTIVIDAD DE OXIDASA DEL AIA DEL EXTRACTO DE CALLO E HIPOCOTILO DE FRIJOL MUNGO (*Phaseolus aureus* Roxb.)

FIGURA 2



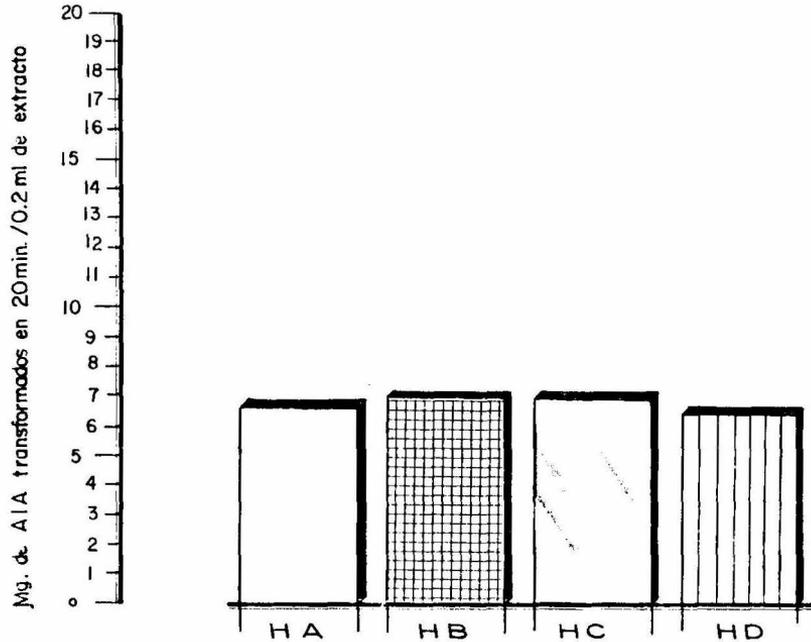
ACTIVIDAD DE OXIDASA DEL AIA DEL EXTRACTO DE CALLO E HIPOCOTILO
DE FRIJOL MUNGO (Phaseolus aureus Roxb.)

FIGURA 3



ACTIVIDAD DE OXIDASA DEL AIA DEL EXTRACTO DE CALLO E HIPOCOTILO DE FRIJOL MUNGO (Phaseolus aureus Roxb.)

FIGURA 4



SIMBOLOGIA %

- HA --- Hipocotilos de germinados de 7 días.
- HB --- Hipocotilos en agua destilada.
- HC --- Hipocotilos con FG 1×10^{-3} M
- HD --- Hipocotilos con FG 1×10^{-5} M

ACTIVIDAD DE OXIDASA DEL AIA DE EXTRACTOS DE HIPOCOTILO DE FRIJOL MUNGO (Phaseolus aureus Roxb.)

Discusión.

Los tejidos muestran necesidades específicas en lo que se refiere a reguladores de crecimiento, estas pueden variar de especie a especie o incluso entre variedades (González, 1986).

Boll (op. cit.) probó diferentes medios de cultivo para determinar el más adecuado para inducción de callo de frijol común (Phaseolus vulgaris); él encontró que el máximo rendimiento de éste lo obtuvo con lo que llama medio M1 el cual contiene las sales minerales de Murashige y Skoog, (cuadro 1) y los componentes orgánicos de White (cuadro 2). Se reprodujo este experimento y se observó la formación de callo de (P. vulgaris), así que este estudio proporcionó las bases para lograr inducir la formación de callo en frijol mungo (Phaseolus aureus Roxb) variando únicamente las proporciones auxina/citocinina, formando lo que se conoce como "cuadro de ajedrez" (González, comunicación personal).

Hay diversos estudios que reportan al FG (floroglucinol) como promotor de la formación de raíces a concentraciones de 1×10^{-3} y 1×10^{-4} M en Malus sp., en Rubus y en el género Prunus. (James y Thurbon, op. cit.; Jones y Hatfield, op. cit.; James, op. cit.; Jones y Hopgood, -

op. cit.)

(Cruz (1983) utiliza AIB (ácido indol butírico) para enraizar brotes de manzano, obteniendo únicamente 40% de enraizamiento y al adicionar FG $1 \times 10^{-3} M$ observa un considerable aumento al enraizar el 80 % de los brotes.)

Moreno (op. cit.) reporta que el FC actúa óptimamente a una concentración de $1 \times 10^{-3} M$, ella observa que ciertos compuestos fenólicos tienen un efecto promotor en el enraizamiento de hipocotilos etiolados de frijol mungo a la misma concentración en la cual el AIA lo tiene (del orden de $1 \times 10^{-5} M$).

En el presente estudio, el FG no promovió la formación de raíces en callo de hipocotilo de frijol mungo (P. aureus), tampoco lo hizo el AIA y sí lo hicieron en hipocotilos.) Esta diferencia en cuanto al efecto de floriglucinol y de ácido indol acético en callo e hipocotilo de frijol mungo (Phaseolus aureus Roxb.) se puede deber a las diferencias en la organización entre ellos.

Los extractos de callo presentaron una actividad de la oxidasa del AIA de más del doble con respecto a la de extractos de hipocotilo. Dado que el callo per se

tiene una actividad tan alta, pudiera ser que los niveles endógenos de AIA no fueran adecuados para desencadenar el evento rizogénico al aplicar AIA ó FG.)

Kurumurti, et. al. (1974) y Chibbar, et. al. 1978) mencionan que los productos de degradación del AIA (tales como el metilenoindol) son los que promueven la formación de raíces.

(En el presente trabajo se observó que hay más del doble de la actividad de la oxidasa del AIA de los extractos de callos con respecto a la de extractos de hipocotilos de frijol mungo (P. aureus), esto indicaría que los niveles endógenos de metilenoindol son altos en el callo y más bajos en el hipocotilo.)

Ahora bien, si se aceptan las hipótesis de los autores antes mencionados, se hubiera esperado (si los tejidos estuvieran en la misma capacidad de responder) que el callo formara gran cantidad de raíces al haber suficiente metilenoindol endógeno para desencadenar el evento. Sin embargo en el presente estudio no fue así, ya que por el contrario el callo no fue capaz de formar raíces mientras que los hipocotilos sí lo hicieron (aún sin adicionar FG). No obstante, puesto que la organización del callo difiere de la del hipocotilo, se sugeri-

ría aplicar metilenoindol a hipocotilos para asegurar que la hipótesis referida, no es aplicable a ésta especie.

Bansal y Manda (op. cit.) y Mato y Vieitez (1986) establecen que hay relación entre la actividad de la oxidasa del AIA y la formación de raíces.

Se considera de forma general que los fenoles actúan por medio de la inhibición o aumento de la oxidación de AIA por enzimas oxidasas del AIA, este efecto parece depender de la estructura molecular, ya que ciertos ortodifenoles inhiben la actividad de oxidasa del AIA, mientras que determinados monofenoles la favorecen (Lee, et. al., op. cit.; Grambow y Langenbeck, 1980) y compuestos como el ácido clorogénico incrementan la producción de AIA a partir de triptófano (Corter, 1969).

Balasinha y Subramonian (1983) aplican ácido para y orto hidroxibenzoico junto con AIB, a explantes de Theobroma cacao y observan un aumento considerable de enraizamiento de éstos. Observan también una disminución de la actividad de peroxidasa, cuando la raíz está completamente formada. Y consideran que este compuesto fenólico protege la destrucción de la auxina; y dada es

ta relación es de esperarse que los niveles endógenos de AIA se correlacionen positivamente con la rizogénesis.

Lee (1980) estudia la influencia de ciertos fenoles en el metabolismo de AIA en tallos de Zea mays in vivo, él observa que el ácido para coumárico y metilumbeliferona actúan como cofactores, y el ácido ferúlico y ácido cafeico como inhibidores de la oxidasa del AIA. Ellos concluyen que la influencia de estos fenoles es la misma in vivo que in vitro.

En el presente trabajo la actividad de la oxidasa del AIA no se correlacionó con la formación de raíces en hipocotilos, ya que no hubo diferencias entre la actividad de extractos de hipocotilos tratados con FG $1 \times 10^{-3}M$ y $1 \times 10^{-5}M$ que tuvieron un incremento en el número de raíces del 100% con respecto a los hipocotilos que no se trataron previamente.

Además el FG in vitro no modificó la actividad de extractos de callo, ni la de extractos de hipocotilo, así que en esta especie Phaseolus aureus Roxb., el FG parece ejercer su acción por medio de otra vía que no es la activación o inhibición de la oxidasa del AIA.)

Una auxina muy importante en la formación de raíces adventicias es el AIB (ácido indol butírico) y se ha reportado un efecto promotor por esta auxina en la rizogénesis de frijol mungo (Phaseolus aureus) (Jarvis y Booth, 1981) y manzano (Malus sp.) (Lane, 1982; James 1983).

Welander y Snygg (1987), estudian la influencia de AIB en la formación de raíces en estacas de 2 variedades de manzano (Malus silvestris L. Mill.) A₂ y (Malus plumila) M26. Además valoran las concentraciones de AIA endógeno. Una de las variedades (A₂), la que contenía los niveles endógenos de AIA más bajos, formó gran cantidad de raíces, aún sin la aplicación exógena de AIB, por lo que se interpreta que la alta capacidad rizogénica no correlaciona con los niveles endógenos de AIA.)

James y Thurbon (op. cit.) mencionan que el FG es un compuesto necesario para la formación de raíces en manzano.

Así que, Alvarez et. al (1989) de acuerdo con estos resultados utiliza FG 1X10⁻³M como constante para el medio de enraizamiento en manzano.

De conformidad con lo anterior, en el presente tra

bajo, se añadió FG no sólo con la idea de que fuese necesario para inducir la formación de raíces en callo de frijol mungo (P. aureus) sino para evaluar si correlacionaba la respuesta rizogénica y la actividad de oxidasa del AIA en presencia de este compuesto. No se encontró correlación y se interpreta que el FG, que estimula rizogénesis en hipocotilos, no lo hace en callo debido a las diferentes organizaciones de ambos, ya que mientras el hipocotilo posee estructuras perfectamente organizadas, White (1967) (citado por Aitchison, et. al., 1977) menciona acerca del callo, que éste, al tener una rápida proliferación celular, pierde toda organización y estructura. Y ya que los mecanismos primarios de morfogénesis y crecimiento están asociados a polarización, al haber una alteración de ésta, el callo no es capaz de responder de la misma forma que el tejido de donde provino (Komizerko, et. al., 1982).

Miller y Gow (1989a, 1989b) mencionan que los gradientes eléctricos están asociados a la actividad de diferenciación en los tejidos.

(Por otra parte, Hasenstein, et. al. (1987) (citados por Hasenstein y Evans, 1988) mencionan que los in-

hibidores de transporte de auxinas bloquean el movimiento de calcio hacia las zonas de crecimiento de raíz, y De Guzmán y De la Fuente (1984), reportan que es el transporte de auxina y no solo su presencia la que aumenta el eflujo de calcio en girasol.

Hay evidencia de que el calcio puede estar involucrado en el transporte polar de auxinas; ya que se descubrió que el EDTA inhibió el transporte en secciones de hipocotilo de Helianthus en un 50% y esta inhibición pudo ser superada por el lavado del tejido en CaCl_2 (De la Fuente y Leopold, 1973).

Quintanar, et. al. (1989) demuestran que el FC $1 \times 10^{-3} \text{M}$ rompe el control respiratorio de mitocondrias de hipocotilo de frijol mungo (Phaseolus aureus Roxb.), a la vez que se asocia calcio inespecíficamente a la membrana mitocondrial (Vázquez, et. al.; 1989), interpretándose que pueden bajar los niveles citoplasmáticos de calcio. Ellos mencionan que este efecto simula el efecto de auxinas; el cual reporta Kubowicz (1988).

En base a lo anterior, parece probable que el FC (floroglucinol) pudiese actuar modificando la distribución de iones en los compartimentos intra y extracelular.

lar. En especial el calcio tiene un papel importante, - ya que las concentraciones de éste a nivel intra y extracelular lo sitúan como un elemento de control idóneo puesto que pequeños cambios en la permeabilidad a éste, desencadenan cambios importantes en la concentración intracelular.

Adicionalmente, Jarvis y Yasmín (op. cit.) reportan un efecto positivo sobre rizogénesis al aplicar calcio exógenamente.

En el presente trabajo, también se valoró el efecto de 2,4 diclorofenol, el cual es usado como cofactor de la oxidación de AIA in vitro, en un estudio realizado por Lee, et. al. (op. cit.) que intenta establecer la relación entre la estructura de fenoles y su efecto sobre la actividad de la oxidasa del AIA (usado peroxidasa de rábano tipo VI). Ellos mencionan que el porcentaje de activación o inhibición dependió de la presencia o ausencia de éste compuesto.

En este trabajo no se encontró relación entre la actividad de oxidasa del AIA y la presencia de 2,4 diclorofenol in vitro. La actividad mostrada en extractos de callos fue alta con respecto a la de hipocotilos, in

dependientemente de la presencia o ausencia de éste com
puesto; probablemente porque no se trata de la peroxidasa de rábano y por lo tanto no requiere tal cofactor, o quizá alguna otra sustancia presente en el extracto actuó como cofactor.

El presente estudio pretende ser una contribución para incrementar el rendimiento en la extracción de la oxidasa del AIA, ya que en este trabajo además de haberse implementado la metodología para obtener callo de hi
pocotilo de frijol mungo (Phaseolus aureus Roxb.), se valoró que en él, la actividad es de más del doble que la de hipocotilos. Se tendría una fuente alternativa para extracción y purificación de enzimas con actividad de oxidasa del AIA del callo.

Ya que hasta ahora solo se ha purificado peroxidasa de rábano, la cual tiene también actividad de la oxidasa del AIA (Lee y Chapman, 1977).

Conclusiones.

- Los callos se formaron en un lapso de 20 días en un medio de cultivo con 0.5 mg/l de 6 furfurilaminopurina y 2 mg/l de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4D).
- Posterior al tratamiento con FG (floroglucinol) y AIA (ácido indol acético) los callos no formaron raíces.
- Los extractos de callo tienen una actividad de la oxidasa del AIA mayor (5 veces por mg. de proteína y más del doble por ml. de extracto) con respecto a la de extractos de hipocotilo.
- El 2,4 diclorofenol in vitro no modificó la actividad de la oxidasa del AIA de los extractos (callo e hipocotilo).
- Hay evidencias de que el FG (floroglucinol) no ejerce su efecto por vía aumento o inhibición de la actividad de la oxidasa del AIA.

Recomendaciones.

Para esclarecer las dudas que surgieron en este -
trabajo se recomienda:

- Valorar la captación de calcio en protoplastos de hipocotilos previamente tratados con auxinas (AIB, AIA) y FC.
- Observar probable modificaciones en la respiración y actividad de ATPasa mitocondrial por efecto de auxinas.
- Valorar el efecto de inhibidores de respiración sobre rizogénesis en esta especie.
- Purificar la oxidasa del AIA para evaluar si el 2,4 - diclorofenol es un cofactor necesario para esta enzima.
- Medir en el callo e hipocotilos los potenciales eléctricos con y sin la aplicación de FG.
- Medir los niveles endógenos de AIA y metilenoindol - en hipocotilos y callo.

Bibliografía.

1. Aitchison, P., A. MacLeod y M. Yeoman. 1977. - Growth patterns in tissue (callus) cultures, en - Plant tissue and cell culture. Ed. H. E. Street. - Univ. of Calif. Berkeley, U.S.A.
2. Alvarez, R., S. J. Nissen y E. G. Sutter. 1989. Relationship between indole-3-acetic acid levels in apple (Malus plumila Mill.). Rootstocks cultured in vitro and adventitious root formation in the presence of indole-3-butyric acid. Plant. Physiol. 89: - 439-443.
3. Balasimha, D. y N. Subramonian. 1983. Role of phenolics in auxin induced rhizogenesis & isoperoxidases in Cacao (Theobroma cacao L.) stem cuttings. - Indian J. Exp. Biol. 21: 65-68.
4. Bansal, M. P., y K.K. Nanda. 1981. IAA oxidase activity in relation to adventitious root formation on stem cuttings of some forest tree species. Experientia 37: 1273-1274.
5. Basu, R. N., K. Mandal y K. G. Chaudhry. 1973. Activity of IAA synthesizing system in relation to synergism between auxin and non-auxinic chemicals in rooting of cuttings. Indian J. Plant. Physiol. 16: 50-56.
6. Bengochea, T. y J. Dodds. 1983. Uso del cultivo de tejidos para almacenar material genético en plantas. Ciencia y Desarrollo 51: 60-64.
7. Bonner, J. 1967. A method for preparation of plant mitochondrial en Methods in enzymology. Cap. 10: 126-130. Ed. Academic Press.
8. Boll, W. F. y D. F. Lian. 1970. Callus and cell - suspension culture of bush bean (Phaseolus vulgaris) Can. J. Bot. 48 (1): 1119-1130.
9. Chibbar, R. N., K. Gurumurti y K. K. Manda. 1978. - Changes in IAA oxidase activity in rooting hypocotyl cutting of Phaseolus mungo L. . Experientia 35: 202 - 203

10. Cruz, P. F. 1983. Propagación in vitro de manzano (Malus plumila Mill.) Tesis Ing. Agrícola F.E.S. y Cuautitlan, U.N.A.M. Cuautitlan Izcalli, Edo. de Mexico.
11. Daniel, W. W. 1982. Bioestadística. Ed. Limusa - México.
12. Demos, E., M. Woolwine, y H. Wilson. 1975. The effects of ten phenolic compounds on hypocotyl growth and mitochondrial metabolism of mung bean. Amer. J. Bot. 62(1): 97-102.
13. De la Fuente, R. K. y A. C. Leopold. 1973. A role for calcium in auxin transport. Plant. Physiol. 51: 845-847.
14. De Guzmán, D. F. y R. K. de la Fuente. 1984. Polar calcium flux in sunflower hypocotyl segments. Plant. Physiol. 76: 347-352.
15. Dix, L. y J. Van Staden. 1982. Auxin and gibberellin-like substances in coconut milk and malt extract. Plant Cell Tissue Organ Culture 1: 239-245.
16. Durán, D. A., et. al. 1988. Manual de técnicas estadísticas. E.N.E.P. Iztacala, U.N.A.M.
17. Feuch, W. y P. S. Schmid. 1980. Effect of orthodihydroxy phenols on growth and protein pattern of callus cultures from Prunus avium. Physiol. Plant. 50: 309-313.
18. González, R. H. 1986. Cultivo in vitro. Ed. Científica. México.
19. Gorter, C. J. 1969. Auxin synergists in the rooting of cuttings. Ibid 22: 497-502.
20. Grambow, H. J. y B. Langenbeck. 1983. The relationship between oxidase activity, peroxidase activity, hydrogen peroxide and phenolic compounds in the degradation of indole-3-acetic acid in vitro. Planta 157: 131-137.

21. Greenwodd, M. S. y G. P. Berlyn 1973. Sucrose indole-3-acetic acid interactions on root regeneration by Pinus lambertiana embryo cuttings. Amer. J. Bot. 60 (1): 42-47.
22. Haissig, B. E. 1970. Influence of indole-3-acetic acid on adventitious root primordia of brittle willow. Planta 95: 27-35.
23. Haissig, B. E. 1974. Influence of auxins and auxin synergists on adventitious root primordia initiation and development. N. Z. J. For. Sci. 4: 311-323.
24. Hasenstein, H. K. y M. L. Evans. 1988. Effects of cations on hormone transport in primary roots of Zea mays. Plant. Physiol. 86: 890-894.
25. Hess, C. E. 1961. A comparative analysis of root initiation in easy and difficult to root cuttings. Proc. Plant. Physiol. 36: (suppl.) XXI.
26. Iwasaki, K. y R. J. Weaver. 1977. Effects of chilling, calcium, cyanamide, and bud scale removal on bud break, rooting, and inhibitor content of buds of "zinfandel" grape. (Vitis vinifera L.). J. Amer. Soc. Hort. Sci.: 102 (5): 584-587.
27. James, D. J. 1979. The role of auxins and phoroglucinol in adventitious root formation in Rubus and Fragaria grown in vitro. J. Hort. Sci. 54 (4): 273-277.
28. James, D. J. 1983. Adventitious root formation in vitro in apple rootstocks (Malus plumila). I Factors affecting the length of the auxin-sensitive phase in M9. Physiol. Plant. 57: 149-153.
29. James, D. J. e I. J. Thurbon. 1979. Rapid in vitro rooting of the apple rootstock M9. J. Hort. Sci. 54 (4): 309-311.
30. James, D. J. e I. J. Thurbon. 1981a. Phenolic compounds and other factors controlling rhizogenesis in vitro in the apple rootstocks M9 and M26. Z. Pflanzenphysiol. 105: 11-20.

31. James, D. J. 1981b. Shoot and root initiation in vitro in the apple rootstock M9 and the promotive effects of phloroglucinol. J. Hort. Sci. 56 (1): 15-20.
32. James, D. J., V. H. Knight.e I. J. Thurbon. 1980. Micropropagation of red raspberry and the influence of phloroglucinol. Sci. Hort. 12: 313-319.
33. Jarvis, B. C. y A. Booth. 1981. Influence of indole-buryric acid, boron, myo-inositol, vitamin D2 - and seedling age on adventitious root development in cuttings of Phaseolus aureus Roxb... Physiol. - Plant. 53: 213-218.
34. Jarvis, B. C., A. H. N. Ali, y A. I. Shaheed. 1983. Auxin and boron in relation to the rooting response and ageing of mung bean cuttings. New Phytol. 95: 509-518.
35. Jarvis, B. C., S. Yasmin, A. H. N. Ali y R. Hunt. - 1984. The interaction between auxin and boron in - adventitious root development. New Phytol. 97: 197-204.
36. Jarvis, B. C. y S. Yasmin. 1985. The influence of calcium on adventitious root development in mung - bean cuttings. Biochem Physiol. Pflanzen 180: 697-701.
37. Jones, O. P. y S. G. Hatfield. 1976. Root initiation in apple shoots cultured in vitro with auxins and phenolic compounds. J. Hort. Sci. 52:234-238.
38. Jones, O. P. y M. E. Hopgood. 1979. The successful propagation in vitro of two rootstocks of Prunus: the plum rootstock Pixy (P. insititia) and the cherry rootstock F12/1 (P. avium). J. Hort. Sci. - 54: 63-66
39. Komizerko, E. J., N. M. Grin y A. V. Gus'Kov. 1982. Bean Phaseolus vulgaris callus tissue culture and - its response to exogenous auxins. Sov. Plant. - Physiol. 28 (6 parte 2) 876-880.

40. Kubowicz, D. D., L. N. Vandehoel y J. B. Hanson. - 1982. ATP dependent calcium transport in plasmalemma preparations from soybean hypocotyls. *Plant. - Physiol.* 69: 187-191.
41. Kurumurti, K., R. N. Chibbar y K. K. Nanda. 1974. Evidence for the mediation of indole-3-acetic acid effects through its oxidation products. *Experientia* 30: 997-998.
42. Lane, W. D. y J. M. McDougald. 1982. Shoot tissue culture of apple: Comparative response of five cultivars to cytokinin and auxin. *Can. J. Plant. Sci.* 62: 689-694.
43. Lee, T. T. y R. A. Chapman. 1977. Inhibition of - enzymic oxidation of indole-3-acetic acid by metabolites of the insecticide carbofuran. *Phytochemistry* 16: 35-39.
44. Lee, T. T. 1980. Effects of phenolics substances on metabolism of exogenous indole-3-acetic acid in maize stems. *Physiol Plant.* 50: 107-112.
45. Lee, T. T., A. N. Starratt y J. J. Jevnikar. 1982. Regulation of enzymic oxidation of indole-3-acetic acid by phenols structure-activity relationships. *Phytochemistry* 21: 517-523.
46. Mato, M. C., M. L. Rúa y E. Ferro. 1988. Changes in levels of peroxidases and phenolics during root formation in Vitis cultured in vitro. *Physiol. - Plant.* 72: 84-88.
47. Mato, M. C. y A. M. Vieitez. 1986. Changes in auxin protectors and IAA oxidases during the rooting of chestnut shoots in vitro. *Physiol. Plant.* 66: 491-494.
48. Middleton, W., B. C. Jarvis y A. Booth. 1978. The boron requirement for root development in stem cuttings of Phaseolus aureus Roxb. *New Phytol.* 81: 287-297.

49. Miller L. A. y A. R. Gow. 1989a. Correlation - between profile of ion-current circulation and root development. *Physiol. Plant.* 75: 102-108.
50. Miller, L. A. y A. R. Gow. 1989b. Correlation - between root generated ionic currents, pH, fusico-ccin, indol acetic acid, and growth of the primary root of Zea mays. *Plant. Physiol.* 89: 1198-1206.
51. Mohinder, P. y K. K. Nanda. 1981. Rooting of etio- lated stem segments of Populus robusta interaction of temperature, catechol and sucrosa in the presen- ce of IAA. *Physiol Plant.* 53: 540-542.
52. Moreno, R.M. 1985. Estudio comparativo de los e- fectos causados por auxinas y compuestos fenólicos sobre la formación de raíces adventicias en estacas de frijol mungo (Phaseolus aureus Roxb.). Tesis E.N.E.P. Iztacala, U.N.A.M.
53. Ondarza, M. R. 1981. Los reguladores de las plan- tas y los insectos. CCMACYT México.
54. Peñalosa, C. I. 1980. Influencia de extractos de plantas de fácil y difícil enraizamiento sobre la - formación de raíces en estacas. Tesis E.N.E.P. Iz- tacala, U.N.A.M.
55. Quintanar, Z. R., S. M. González e I. C. Peñalosa. 1989. El floroglucinol afecta el control respirato- rio en mitocondrias de germinados de frijol mungo. VIII Coloquio de Investigación. Memorias E.N.E.P. Iztacala, U.N.A.M.
56. Reyes, C. N. 1982. Diseño de experimentos aplica- dos. Ed. Trillas México.
57. Talvar, G., J. P. S. Denday y V. K. Gupta. 1985. Kinetic properties of IAA oxidase from mung bean co- tyledons. *Phytochemistry* 24: (4): 673-676.
58. Vázquez, M. J., S. M. González e I. C. Peñalosa. 1989. Efecto del floroglucinol sobre la captación mitocondrial de calcio. VIII Coloquio de Investiga- ción. Memorias E.N.E.P. Iztacala, U.N.A.M.

59. Villalobos, M. V., T. A. Thorpe y E. C. Yeung. 1983. Aplicaciones del cultivo de tejidos en especies forestales. *Ciencia y Desarrollo* 51:439-443.
60. Welander, M. e I. Huntrieser. 1981. The rooting ability of shoots raised in vitro from the apple - rootstock A2 in juvenile and in adult growth phase. *Physiol Plant*. 53: 301-306.
61. Welander, M. y J. O. Snygg. 1987. Effect of applied and endogenous auxin on callus and root formation of in vitro shoots of the apple rootstocks M26 and A2. *Annals Bot.* 59: 439-443.
62. Wong, E. 1973. *Plant phenolics*. Vol. 1 Ed. Academic Press London.
63. Zimmerman, R. H. 1984. Rooting cultivars in vitro interactions among light, temperature, phloroglucinol and auxin. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 3: 301-311.
64. Zurfluh, L. y T. Guilfoyle. 1980. Auxin induced changes in the patterns of protein synthesis in soybean hypocotyl. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 357-361.
65. Zurfluh, L. Y T. Guilfoyle. 1982. Auxin induced changes in the population of translatable messenger RNA in elongating sections of soybean hypocotyl. *Plant. Physiol.* 69: 332-337.