



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
" I Z T A C A L A "

EFECTO DEL FLOROGLUCINOL, AIA Y AIB
EN LA RIZOGENESIS Y LA AIA-OXIDASA
DE FRIJOL MUNGO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
CESAR MATEO FLORES ORTIZ



JUNIO DE 1992

DEDICATORIA

CON TODO MI RESPETO A LA MEMORIA DE CARLOS FLORES RUIZ

CON TODO MI CARISO A CARMEN ORTIZ GONZALEZ

CON TODO MI AGRADECIMIENTO A JUAN CARLOS FLORES ORTIZ

VER, OIR, NO INTERRUMPIR, CALLAR
SIEMPRE FUE LO MAS IMPORTANTE

ANONIMO

El presente trabajo de tesis se realizo en el laboratorio de bioquímica de la unidad de morfofisiología de la Escuela Nacional de Estudios Profecionales Iztacala, bajo la dirección del M. en C. Ignacio Peñalosa Castro

AGRADECIMIENTOS

Agradezco las observaciones, apoyo y confianza depositadas en mi desde el principio por el M. en C. Ignacio Peñalosa Castro. También al M. en C. Sergio Gonzalez Moreno por la facilitación de los reactivos, equipo, espacio y paciencia. De manera muy especial toda mi gratitud por su contribución durante mi formación como biólogo.

Mi reconocimiento a todas aquellas personas que me apoyaron y que no nombro por la pena de omitir a alguno.

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
1.- RESUMEN	1
2.- INTRODUCCION	2
3.- ANTECEDENTES	5
4.- MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS	14
4.1.- OBTENCION DE PLANTULAS	14
4.2.- CORTE Y TRATAMIENTOS	14
4.3.- OBTENCION DEL EXTRACTO CRUDO	15
4.4.- SEPARACION ELECTROFORETICA	16
4.5.- REVELADO DE LA AIA-OX	16
4.6.- ACTIVIDAD TOTAL DE AIA-OX	16
4.7.- FORMACION DE OXINDOLES	17
4.8.- EFECTO <i>IN VITRO</i> SOBRE PEROXIDASA PURIFICADA DE RABANO	17
5.- RESULTADOS	18
5.1.- PROMOCION RIZOGENICA	18
5.2.- PATRONES ISOENZIMATICOS DE AIA-OX	20
5.3.- ACTIVIDAD DE AIA-OX	24
5.3.1.- CONSUMO DE OXIGENO	24
5.3.2.- FORMACION DE OXINDOLES	26
5.3.3.- EFECTO SOBRE PEROXIDASA DE RABANO TIPO II	27
6.- DISCUSION	31
7.- CONCLUSIONES	40
8.- REFERENCIAS	41

RESUMEN

LOTES DE ESTACAS DE FRIJOL MUNGO FUERON TRATADAS CON ACIDO INDOLE-3-ACETICO (AIA), ACIDO INDOLE-3-BUTIRICO (AIB), FLOUROGLUCINOL (FG), AIA+FG Y AIB+FG A UNA CONCENTRACION DE 10^{-4} M Y SE VALORO EL EFECTO DE ESTOS TRATAMIENTOS A LOS 4 Y 8 DIAS EN LA FORMACION DE RAICES ADVENTICIAS, LOS PATRONES ISOENZIMATICOS DE AIA-OXIDASA (AIA-ox) Y LA ACTIVIDAD DE AIA-ox EN SOLUCION PARA EL CONSUMO DE AIA Y LA FORMACION DE OXINDOLES. TAMBIEN SE ESTUDIO EL EFECTO DE AIA, AIB, FG Y PEROXIDO DE HIDROGENO EN LA ACTIVIDAD DE AIA-ox DE PEROXIDASA PURIFICADA DE RABANO TIPO II.

LOS RESULTADOS INDICAN LA MAYOR PROMOCION RIZOGENICA (47.58 RAICES POR ESTACA) EN EL LOTE CON AIB+FG A LOS 8 DIAS DE TRATAMIENTO, MIENTRAS QUE EL CONTROL FORMO 15.76. LOS PATRONES ISOENZIMATICOS DE AIA-ox MUESTRAN DIFERENCIAS EN EL TALLO Y LA RAIZ, AL MISMO TIEMPO QUE EN AMBOS CASOS SE NOTA UNA BANDA CATIONICA CON Rf DE 0.642. LOS PATRONES DE AIA-ox DE LOS EXTRACTOS DE LOS TRATAMIENTOS MUESTRAN UNA MEZCLA DE PATRONES DE RAIZ Y TALLO Y LAS ISOENZIMAS CORRESPONDIENTES A LA RAIZ CON Rfs DE 0.085 Y 0.514 FUERON MAS INTENSAS MIENTRAS LA CANTIDAD DE RAICES ERA MAYOR. POR SU PARTE LA ACTIVIDAD DE AIA-ox SE CORRELACIONO CON LA CANTIDAD DE RAICES A LOS 4 DIAS EN FORMA PROPORCIONAL, EL LOTE TRATADO CON AIB MOSTRO 189.25 Y EL CONTROL 86.62, MIENTRAS QUE A LOS 8 DIAS LOS LOTES MOSTRARON VALORES SEMEJANTES DE ACTIVIDAD INDEPENDIENTEMENTE DE LA CANTIDAD DE RAICES; CON 422.08, 436.42 Y 464.07 PARA C, AIA Y AIB RESPECTIVAMENTE. PARA LOS CASOS DONDE HABIA PRESENCIA DE FG DONDE LA ACTIVIDAD FUE MENOR; CON 264.27, 284.75 Y 262.29 PARA FG, AIA+FG Y AIB+FG RESPECTIVAMENTE. DE LOS ESPECTROS OBTENIDOS CON PEROXIDASA PURIFICADA DE RABANO SE OBSERVO QUE LA PRESENCIA DE FG CONDUCA A LA FORMACION DE DERIVADOS INDOLICOS EN LA OXIDACION DE AIA CON MAXIMOS DE ABSORBANCIA EN 278 Y 284 nm, MIENTRAS QUE EN SU AUSENCIA Y PRESENCIA DE PEROXIDO DE HIDROGENO SE PRODUCIAN DERIVADOS OXINDOLICOS CON PICOS MAXIMOS ENTRE 250 Y 260 nm.

SE DISCUTE QUE LA RELACION DE LA RIZOGENESIS Y LA ACTIVIDAD DE AIA-ox SE DA EN LOS PRIMEROS DIAS DESPUES DEL TRATAMIENTO Y QUE EL FG ACTUA COMO ANTIOXIDANTE POR SU INTERACCION CON EL PEROXIDO DE HIDROGENO.

2.- INTRODUCCION

La producción de alimentos es una de las tareas con más alta prioridad en la sociedad, por lo que se justifica cualquier esfuerzo destinado a aumentar la productividad del campo.

En México la producción de alimentos agrícolas mantiene un déficit de granos que no cubre la demanda interna, por lo cual se depende de la importación de cerca del 40% del consumo nacional como, lo describe Mata, E. (1987). La situación crítica de dependencia de alimentos de economías extranjeras, impone la impostergable necesidad de analizar alternativas que ofrezcan pautas para el desarrollo de estrategias que aumenten la productividad del campo mexicano.

De las prácticas que prometen incidir en forma directa sobre el aumento en la productividad del campo están: el mejoramiento genético de las variedades de especies de interés alimenticio para dar mejores rendimientos en cuanto a la producción de biomasa; la resistencia a plagas o la adaptación a situaciones de stress medioambiental como la sequía o salinidad. Por otra parte, a pesar del gran potencial que ofrece la utilización de reguladores del desarrollo en vegetales en la optimización de prácticas agrícolas, es alternativa con poco arraigo en la gran mayoría de los productores del campo. En México, como lo describe Larke, A. y Reyes, R. (1988), en primer lugar, la oferta de hormonas vegetales en el mercado mexicano no satisface las demandas de estos estimulantes, además de que las prácticas empíricas impiden una incidencia importante de estas alternativas; en cambio tecnologías de vanguardia como el cultivo de tejidos, son importante destino de estos productos.

Los reguladores de desarrollo como las auxinas han sido estudiadas ampliamente. Este tipo de hormonas tiene en común el estímulo para el alargamiento celular como lo describen Rojas, M. y Ramirez, H. (1987). Su efecto característico a nivel de organización de tejidos y desarrollo anatómico resulta en el control sobre procesos importantes del desarrollo de la planta como: la elongación del tallo, la regulación

del proceso de floración, la maduración de los frutos, la tendencia hacia la dominancia apical y la formación de raíces laterales Evans, M (1984). Este último proceso reviste importancia en función de que en la medida que la formación de raíces adventicias sea un proceso que se manipule a conveniencia, se puede lograr el enraizamiento de especies de difícil o nulo enraizamiento y por tanto se puede optimizar la propagación asexual de variedades con caracteres favorables, mediante el enraizamiento de estacas como, lo describen Rojas, M. y Ramirez, H. (1987). Esta opción presenta la ventaja de que los caracteres favorables no son segregados sexualmente como, sería el caso de la propagación por semillas.

El Acido Indol-3-acético (AIA), es la auxina más ampliamente estudiada en relación con la promoción de enraizamiento. Thimann, L. (1974) hace una reseña histórica de las investigaciones sobre el AIA; y señala la existencia de una gran cantidad de compuestos con propiedades auxínicas, unos de origen natural y otros sintetizados artificialmente, como el Acido Indol-3-butírico (AIB), el cual estimula la formación de raíces de manera importante. Más recientemente el AIB fue aislado como un producto natural de plántulas de Chícharo, como lo reporta Schneider, E. et al (1985).

Se ha reconocido que en la regulación del metabolismo del AIA intervienen sustancias fenólicas que inhiben enzimas que oxidan al AIA. Al mismo tiempo, se sabe que los fenoles son reguladores del crecimiento en las plantas como lo analizan Wain, R. y Taylor, H. (1965). Uno de estos fenoles reconocidos por intervenir en este proceso auxínico es el Floriglucinol (FG) como lo indica Jones et al (1976).

Los mecanismos de los que se sirve el AIA para efectuar estímulos sobre la elongación, los procesos para regular este estímulo y los elementos que se involucran en el fenómeno han sido materia de intensas investigaciones. En el presente trabajo se describen los resultados del efecto *in vivo* del AIA, AIB, FG y sus combinaciones, sobre la formación de raíces laterales en estacas de frijol mungo (*Phaseolus mungo*). Por otra parte, se registra el efecto de estos tratamientos sobre el

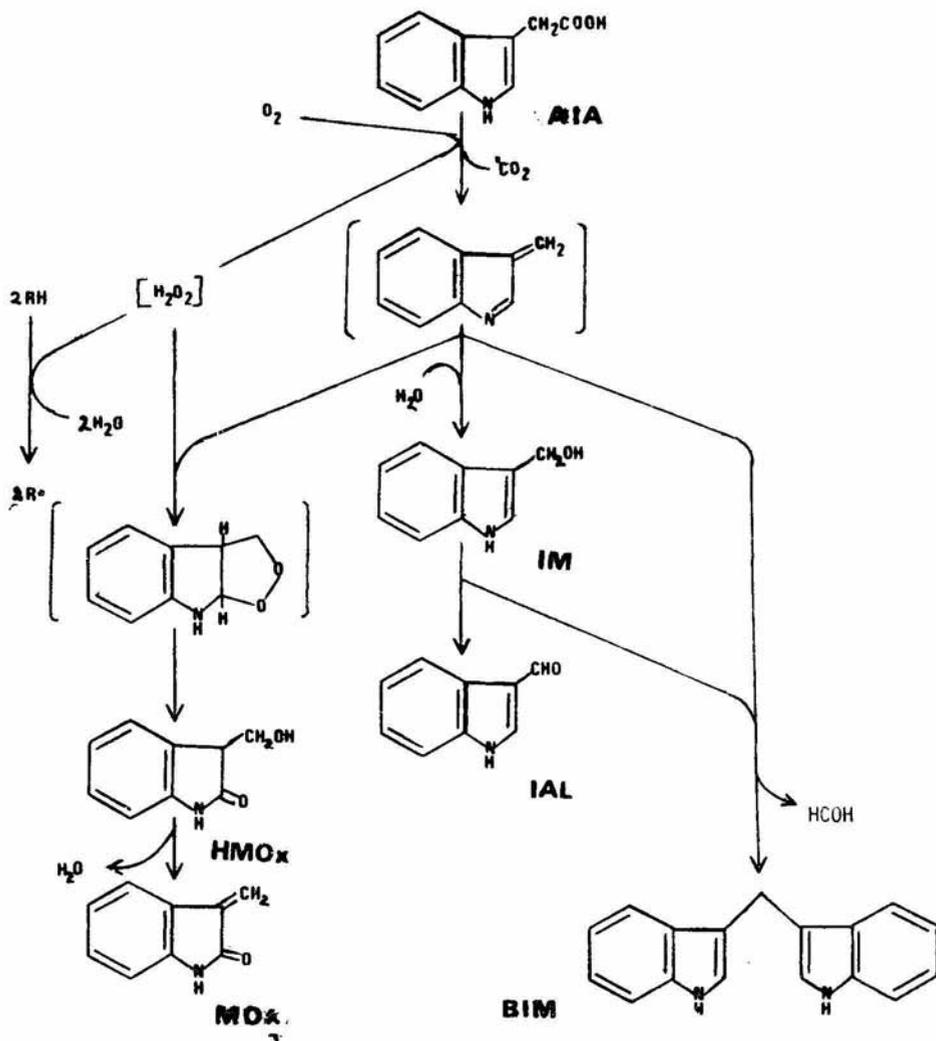
polimorfismo enzimático de la AIA-Oxidasa (AIA-ox) y su actividad total; también se estudia el efecto *in vitro* del FG y AIB en la oxidación del AIA por Peroxidasa Purificada de Rábano Tipo II y se discute la relación de dichas variables con los mecanismos de regeneración del sistema radicular. El estudio tiene como modelo experimental al Frijol mungo (*Phaseolus mungo* sinonimia *Vigna radiata*).

3.- ANTECEDENTES.

El metabolismo del AIA se ha tomado como un mecanismo regulador de los efectos de la hormona en la planta. En principio se ha reconocido, como lo describe Kefeli, V. (1978), que el precursor inicial de la ruta biosintética del AIA es el Acido Shikimico y como precursor intermediario el Triptófano. Sembdner, G. et al (1980) describe que el triptófano puede seguir dos vías alternativas hacia la formación de AIA, la vía de la Triptamida y la del Acido Indol Pirúvico, las cuales convergen en el Indol Acetaldehído, que es el precursor inmediato del AIA. Por otra parte, se ha observado que el principal sitio de síntesis del AIA está en las partes apicales de la planta, y que éste se trasporta basipétalmente, como lo indican Wareing, P y Phillips, I. (1978).

Se ha detallado el metabolismo del AIA y se propone que la actividad de AIA-ox regula los niveles internos de la hormona. De los productos finales de la oxidación del AIA se ha reconocido que el 3-Metilen Oxindol es el principal, (Hinman y Lang 1965). Posteriormente se sugiere que la vía degradativa del AIA es ramificada y que de acuerdo a las condiciones de reacción se pueden seguir dos vías alternativas. Grambow y Langenbeck (1983) estudian estas dos vías y concluyen que: en ausencia de fenoles la oxidación del AIA tiende principalmente hacia la formación de 3-Metilen Oxindol (vía oxindólica). En este caso el Peróxido de hidrógeno formado durante la oxidación-descarboxilación del AIA se fija en un paso intermediario para la formación del Hidroximetil Oxindol que es el precursor inmediato del 3-Metilen Oxindol. Por otra parte, en presencia de Fenoles el Peróxido de Hidrógeno formado es captado por éstos y el proceso se desvía hacia la formación de derivados indólicos, en la cual el Indol Metanol se condensa para formar Bis-Indolyl Metano o simplemente se deshidrata para originar Indol Aldehído (vía indólica). La vía descrita antes se puede observar en el esquema 1.

Se han aislado alternativamente otros productos finales en función de la especie y de las condiciones de la reacción. Reinecke, D. y Bandurski, R. (1988), reportan que en *Zea mays* en condiciones



ESQUEMA No. 1 RUTAS ALTERNATIVAS PARA LA DEGRADACION DE AIA; RH=FENOL; IM=INDOL 3-METANOL; AIL=INDOL-3-ADEHIDO; HMOx=3-HIDROXIMETILOXINDOL; BIM=BISINDOLYLMETANO ; MOx-METILENOXINDOL...

aerobias, el producto final del metabolismo del AIA es el Oxindol-3-acético. Pluss,R y colaboradores (1989) registraron la formación de un nuevo producto :el Acido 2-indolona-3-acetilaspártico en *Populus tremula*, que representa un conjugado entre un aminoácido y un derivado del AIA, estos conjugados con aminoácidos se forman característicamente de las aplicaciones exógenas de AIA, Mollan, R. et al (1972).

Otro caso bien documentado del estudio de las auxinas es el del AIB, el cual es reconocido por sus efectos importantes en la formación de raíces laterales. Al AIB se le ha atribuido su intensa estimulación por ser una hormona sintetizada artificialmente suponiéndose que no existe la maquinaria metabólica necesaria para su degradación, sin embargo, los estudios de Riou,J.y Epstein,E (1988) en *Phaseolus mungo* demostraron que la velocidad de degradación del AIB y del AIA son semejantes, aunque los productos formados son diferentes. Además, un estudio de identificación de auxinas endógenas extraídas de chícharo reveló la presencia del AIB sin una previa adición exógena de esta hormona como lo publicaron Schneider,E. et al(1985).

Se ha encontrado que los productos finales de la oxidación del AIA identificados tienen propiedades auxínicas, y que en algunos casos superan el estímulo que el AIA produce por sí mismo. Basu,P.y Tuli,V. (1972) reportan que el Metilen oxindol resulta más efectivo en el estímulo para el crecimiento de *Triticum vulgare*; por lo contrario, los productos finales aislados por Pluss,R.et al(1988) no revelaron tener ningún estímulo para la formación de raíces adventicias en *Populus tremula*.

Se han estudiado con detalle las enzimas relacionadas con la oxidación del AIA. En primer lugar hay que mencionar que se reconoce que las Peroxidasas (Pxs) muestran actividad de AIA-ox en la mayoría de los ensayos, sin embargo, existen casos excepcionales, los cuales presentan actividad AIA-ox sin actividad Pxs .Talwar,G. et al (1985) reportan haber aislado de *Vigna radiata* AIA-ox sin actividad de Pxs y otras isoenzimas que sí mostraban ambas actividades. Estas difieren, en sus migraciones electroforéticas, en sus parámetros cinéticos y en

sus pHs óptimos de actividad. La oxidación del AIA *in vitro*, por parte de peroxidasas, es un fenómeno frecuente, sin embargo, como lo discute Huystec,R.(1987), puede ser resultado de condiciones artificialmente creadas al momento de la extracción de la enzima o al momento de su cuantificación. En este mismo sentido Sondheimer,E y Griffin,D (1960) habían discutido inicialmente que la oxidación que se observa del AIA carece de sentido fisiológico en la planta y que de la misma manera es resultado de condiciones artificiales. Pressey (1990) argumenta que el gran número de cofactores que estimulan la oxidación del AIA por Peroxidasas es una razón importante para pensar que este fenómeno no se da en forma natural. A pesar de esto, los reportes acerca de la polifuncionalidad de las Pxs son abundantes, como lo describe Talwar,G. et al. (1985). Así mismo Grison,R. y Pilet,P.(1985) reconocen este fenómeno y en su reporte enlistan una amplia gama de sustratos susceptibles de oxidarse por Pxs. Las evidencias hasta ahora indican la correlación estrecha de la actividad de AIA-ox y Pxs con los niveles de la hormona y la formación de raíces; las especulaciones acerca de la legitimidad fisiológica del fenómeno requieren investigaciones en ese sentido.

Se ha estudiado la localización de la actividad de AIA-ox y en términos generales se ha reconocido que existe una variación de actividad en función de la madurez de los tejidos y de la localización anatómica de éstos. Goldberg,R. et al (1986) reportan que en tejidos de Frijol Mungo, la mayor parte de la actividad se da en tejidos jóvenes y disminuye gradualmente en los tejidos más maduros. Resultados similares fueron publicados por Valpuesta,V y Bukovac,M.(1983), reportando que en *Prunus cerasus* la actividad de AIA-ox desciende en función del desarrollo de la planta. En cuanto a la localización anatómica de la oxidación del AIA Sergeeva,L .et al (1985), registraron una disminución de actividad AIA-ox en un gradiente basipetálico en plantas de *Nicotina tabacum*. El mismo gradiente de actividad fue reportado por Goldberg,R et al (1986) en hipocotilos de frijol mungo

En su conjunto los estudios de la variación de actividad de AIA-ox en función de la madurez de los tejidos y a lo largo de los

hipocotílos han dado lugar a el planteamiento de la Hipótesis de una alta actividad de AIA-ox necesaria para el inicio de la formación de raíces, como la plantearan originalmente Chibbar, R. *et al* (1979) tomando como modelo experimental al *Phaseolus mungo*. Este planteamiento conserva congruencia con la idea de que los productos de la oxidación de AIA son los necesarios para la estimulación rizogenética, como lo señalan Basu, P. y Tuli, V. (1972), proponiendo que el producto activo es el Metileno-Oxindol. Para este mismo producto Demorest, D y Stahamann, M. (1972) investigaron el efecto que tenía a nivel genético, concluyendo que se da un tipo de regulación para la expresión de genes determinados por la unión del Metileno-Oxindol a histonas en lugares específicos con restos de arginina. Una revisión amplia de esta teoría de regulación fue compilada por Theologist, A. (1986) quien concluye que el fenómeno de diferenciación es un proceso en el cual se suceden una rápida acumulación de RNAm, una acidificación del medio exterior de la célula y la posterior elongación de la célula. Estos eventos son desencadenados por el AIA. La Teoría ácida descrita es un modelo para la explicación del proceso de elongación que promueven las auxinas.

Bansal, M y Nanda, K (1981), en una interpretación integrativa de la hipótesis de trabajo de "La enzima activa", presentan los siguientes postulados, en un intento de relacionar los niveles de actividad de AIA-ox con el proceso de formación de raíces adventicias:

- 1.-Si la actividad de AIA-ox esta inhibida, los niveles de AIA llegan a una concentración supra-óptima, la cual se vuelve tóxica para la planta, mientras que si los niveles se mantienen infra-óptimos la estimulación para la elongación es un proceso factible.
- 2.-Al oxidar al AIA la enzima genera productos oxidados que tienen más actividad fisiologica de estímulo que el mismo AIA.
- 3.-La AIA-ox puede actuar en forma coordinada junto con otras enzimas, como la Fenolasa para formar conjugados AIA-fenólicos, que promueven el estímulo.

La localización de la enzima a nivel celular es un criterio

importante para definir los detalles de la teoría de regulación propuesta. Goldberg, R. et al (1986) analizó a nivel subcelular la localización de la actividad Pxs encontrando que la mayor cantidad de actividad estaba limitada a la pared celular y la parte soluble del citoplasma, aunque también había registros mínimos de actividad en membranas. En el caso de Pxs a nivel de la envoltura celular se ha encontrado que existen dos tipos de Pxs; unas unidas iónicamente y otras en forma covalente, como lo publicó Demorest, D. y Stahamann, M (1972). Por otra parte el AIA demostró estar acumulado en la pared celular, en el núcleo y en la vacuola, según estudios de Driss, D. y Perbal, G. (1987) en *Lycopersicon esculentum*.

En particular la AIA-ox se ha reportado como una glucoproteína cuyos constituyentes carbohidratos contribuyen a la conformación tridimensional, como lo discuten Chibbar, R. et al. (1972) al trabajar con extractos de *Phaseolus mungo*. Por otra parte, se ha reconocido que el sitio activo de la enzima es un grupo Ferroporfirínico como lo mencionan Lee, T. et al (1982); este último reporte sostiene que la oxidación del AIA se inhibe en forma competitiva por Orquinol y compuestos Fenantrénicos relacionados. Goldberg, R. et al (1986) indican la utilización de otros inhibidores específicos de la AIA-ox como el Cianuro de Potasio y el Dietiltiocarbamato, encontrando que se presenta también un tipo de inhibición competitiva. En cuanto a la cinética típica de las isoenzimas con esta actividad existe variación; Valpuesta, V y Bukovac, M. (1983) reportan la existencia de dos isoenzimas de AIA-ox en extractos de *Prunus cerasus* y encuentran que tienen cinéticas diferentes; una isoenzima I1 trazó una cinética típica hiperbólica, mientras que la isoenzima I2 mostró cinética sigmoidal. La regulación alostérica del AIA hacia la AIA-ox ha sido discutida previamente por Chibbar, R. et al (1972).

La regulación de la actividad de la AIA-ox se ha estudiado con esmero. La participación de fenoles en la actividad de la enzima está bien documentada en la publicación de Lee, T. et al (1978); en ella concluyen después de analizar una larga lista de fenoles probados en la degradación de AIA por Peroxidasa purificada de Rábano; que:

1.-Los monofenoles producen activación cuando ningún otro cofactor está presente; los fenoles *p*-sustituídos son más activos que los *o*- o *m*-sustituídos. En presencia de Diclorofenol(DCP), se observa desde una ligera activación hasta una fuerte inhibición.

2.-Los *m*-difenoles también producen activación en ausencia de otros cofactores, mientras que los *o*- y *p*-difenoles con excepción de la 3,4-dihidroxiacetofenona y 3,4-dihidroxiopropiofenona, producen una fuerte inhibición en presencia de DCP. Los *o*-difenoles son degradados en el medio de reacción de la enzima y por tanto estos producen sólo una inhibición temporal.

3.-Los *m*-difenoles y la 3,4-dihidroxiacetofenona producen una inhibición permanente en presencia de DCP.

4.-La sustitución en la posición 2 altera significativamente la actividad de los *m*-difenoles.

5.-La *o*-metilación altera la actividad de los *o*-difenoles.

La intervención de los fenoles en la oxidación del AIA se plantea en dos posibles formas: la primera, como lo discute Lee, T. *et al* (1978) a través del sitio activo de la enzima por competencia de los grupos hidroxilo de los fenoles; y la segunda, por la reacción de estos mismos fenoles con intermediarios de la degradación del AIA como lo discute Grambow, H. y Schwich, L. (1983). En forma general, se reconoce la estimulación del efecto auxínico por parte de los fenoles; Fadl, M. y Hartmann, H. (1966), reconocieron en principio este fenómeno y lo definieron como sinergismo fenólico.

En la lista de Lee, T. *et al* (1978) no se reconoce una importante función de Trifenoles en la función de la AIA-ox, sin embargo, el uso de trifenoles como el FG ha mostrado una importante promoción de la formación de raíces laterales, principalmente en manzano. Jones, O. *et al* (1976), estudiaron este efecto en tallos de manzano. La particularidad del FG es que muestra una simetría radial de los sustituyentes hidroxilos alrededor del anillo bencénico en posición

1,3,5.

Además del efecto observado por parte de los fenoles sobre la actividad de AIA-ox, se sabe que cofactores como el manganeso son necesarios para la actividad; como lo determinaron Basu,P. y Tuli,V. (1972) .

Estudios de Pressey,R.(1990) con Pxs purificada de *Lycopersicon esculentum*, demostraron que ciertos aniones activan significativamente la oxidación del AIA. Los aniones derivados de Fosfatos demostraron uno de los mayores efectos en la estimulación de la actividad; el caso del Nitrilotriacetato fue de los aniones valorados, el que estimuló en forma más intensa. Otra modulación que se ha revisado en la oxidación del AIA es por parte de ácidos dicarboxílicos; Milrad,S.y Tiger,H.(1983) dan cuenta de la activación que se da *in vitro* de la oxidación del AIA por parte de varios ácidos dicarboxílicos en extractos de *Glycine max*. La presencia del Acido Oxálico fue la que estimulo mayormente la actividad de la enzima.

La amplia gama de moduladores que se han observado para la actividad de AIA-ox, requiere de una interpretación integral que no puede resultar en relaciones rectas ni sencillas para la función fisiológica del sistema oxidante del AIA y su regulación. Ciertamente, deben existir mecanismos integrados en muchas direcciones para que las concentraciones de la hormona sean la circunstancia que en primer término determine el disparo del fenómeno. Los derivados del catabolismo o de fotosintatos, los estadios del desarrollo de la planta, la ubicación anatómica de los tejidos y en general las características específicas de la especie están relacionados en una intrincada regulación retroalimentada que mantiene las concentraciones necesarias de la hormona y en último término regula la acción efectora de la misma.

En consideración de todo lo mencionado anteriormente. En el presente estudio se valoraron aspectos particulares de la actividad de AIA-ox de frijol mungo. Por una parte se valoró el efecto *in vivo* del AIA y del AIB en la formación de raíces adventicias, además de

observar el posible efecto que tenía el FG en combinación con el AIA y el AIB. Por otra parte se determinó el efecto de los tratamientos con AIA, AIB, FG y sus combinaciones en la actividad de AIA-ox en y en sus patrones isoenzimáticos, y finalmente se estudió el cambio del espectro de Absorción en el rango de ultravioleta antes y después de la oxidación del AIA por Peroxidasa purificada de Rábano en presencia de Peróxido de Hidrógeno, FG y AIB.

4.- MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

4.1.-OBTENCION DE PLANTULAS

La selección de *Phaseolus mungo* como modelo experimental se hizo considerando las recomendaciones de Hess,Ch.(1961); indica que esta especie ofrece las ventajas de una rápida germinación y desarrollo de la planta; además, por su pequeño tamaño se puede obtener una población abundante en una área reducida, aunado a que responde al estímulo para el enraizamiento con otras sustancias además del AIA.

Se lavaron 25 g de semillas de *Phaseolus mungo* de origen comercial con agua corriente. Posteriormente se sumergieron en Hipoclorito de Sodio comercial al 4% durante 25 minutos; se lavaron nuevamente con agua destilada hasta eliminar todos los residuos del desinfectante utilizado. Durante las 48 horas siguientes se mantuvieron sumergidas en agua y en condiciones de obscuridad con cambios periódicos de agua. Una vez hidratadas las semillas, se trasladaron a un recipiente de 30x30x10 cm que contenía agrolita hasta un 50% de su capacidad; la agrolita se mantuvo a su máxima hidratación utilizando exclusivamente agua destilada. Los recipientes permanecieron durante 4 días en una cámara de germinación con obscuridad permanente, con una temperatura de 28°C y con una humedad relativa de 40%. Al término de estos días se obtuvieron plántulas de 8 cm de longitud en promedio, del brote de la raíz principal al ápice.

4.2.- CORTE Y TRATAMIENTOS.

Las plántulas obtenidas se cortaron en la parte del hipocotilo a una distancia de 7 cm del nodo cotiledonar utilizando tijeras para evitar estrangulamiento en el lugar del corte; estos segmentos mantenían las hojas. Se formaron cinco grupos experimentales y un testigo con 50 plántulas cada uno, a los que se sometió a los siguientes tratamientos:

GRUPO	TRATAMIENTO
1.-CONTROL	Agua destilada
2.-AIA	Acido Indol-3-Acético 100 μM
3.-AIB	Acido Indol-3-Butírico 100 μM
4.-FG	Floroglucinol 100 μM
5.-AIA+FG	Floroglucinol 100 μM ,Acido Indol-3-Acético 100 μM
6.-AIB+FG	Floroglucinol 100 μM ,Acido Indol-3-Butírico 100 μM

Las soluciones para los tratamientos se preparaban en Stocks 10X. Para los casos de AIA y AIB se utilizaban gotas de KOH 1 N para disolverlas en agua destilada.

Los tratamientos descritos arriba se aplicaron a las plántulas sumergiéndolas hasta una profundidad de 4 cm del corte realizado y permaneciendo así durante un espacio de 24 horas; posteriormente se trasladaron a agua destilada y así se mantuvieron durante 8 días en obscuridad permanente, humedad relativa de 40% y temperatura de 28°C. Los procedimientos y tiempos se definieron siguiendo las indicaciones de Hess.Ch.(1961).

En observaciones preliminares se estableció que la emergencia de las raíces se iniciaba a partir del cuarto día y eran suficientemente conspicuas a los 8 días. El efecto promotor de los tratamientos descritos se valoró a los intervalos de 4 y 8 días. Se consideró el número de raíces formadas por cada plántula.

4.3. - OBTENCION DEL EXTRACTO CRUDO

De las plántulas se hicieron extracciones ,a los 4 y 8 días, de la siguiente forma:5 g de hipocotilos se lavaron con agua destilada y se homogenizaron en 7 ml de buffer Tris-HCL 5 mM pH 7.6. El homogenizado se filtró en 8 capas de gasa con poro de 2 mm y posteriormente se centrifugó a 10,000xg; el sobrenadante se recuperó

y fue considerado extracto crudo. Todas las operaciones se llevaron a cabo a 4°C. La proteína del extracto crudo se determinó de acuerdo a la técnica descrita por Bradford, M (1976).

4.4. -SEPARACION ELECTROFORETICA

La separación electroforética se llevo a cabo en gel de poli-acrilamida, en sistema discontinuo con una concentración final de 7.5% de Acrilamida, siguiendo el procedimiento descrito por Davies, B. (1964). La corrida se realizó en sistema de buffer no disociante de Tris-Glicina 0.1 M pH 8.3. Se prepararon los geles en un tubo de cristal de 5 mm de diámetro interior y de 10 cm de largo. El extracto crudo se depositó en la parte superior del tubo ajustando la proteína a 100 µg por tubo. Se aplicó una corriente de 2 mA por tubo durante la primera hora y aumentando a 4 mA por gel durante las siguientes 1.5 horas o hasta que el colorante de indicador de corrida estaba a punto de salir del gel. Todas las operaciones de separación se llevaron a cabo a 4°C.

4.5. - REVELADO DE LA AIA-ox

Para revelar el patrón isoenzimático de la AIA-ox se sumergieron los geles en un medio de revelado que describe Talwar, G. et al (1985), el cual contenía 1 parte de la solución A (4 mg de Azul Rápido BB base/ml de Etanol), 2 partes de la solución B (16.4mg de Acido p-cumárico+17.6mg de AIA disueltos en Etanol y aforados a un volumen de 50 ml +2.4ml de Peroxido de Hidrógeno al 0.1%) y 1 parte de la solución C (buffer de Acetato de Sodio 0.2M pH 4.2). Los geles se mantuvieron en esa solución a temperatura ambiente y en obscuridad hasta que las bandas cafées eran evidentes.

4.6. - ACTIVIDAD TOTAL DE AIA-ox

Se utilizó el extracto crudo obtenido de la forma antes descrita. La actividad de oxidación de AIA se valoró polarográficamente siguiendo la disminución de oxígeno en la celda de reacción como lo describen Kokkinakis y Brooks (1979).

Se adicionaron 150 μg de proteína cruda a un medio de reacción que contenía: Citrato de Sodio 3.5 mM, DCP 100 μM , MnCl_2 40 μM y AIA 200 μM ajustando con HCl a pH 4.2. La adición de Peróxido de Hidrógeno a una concentración final de 6 μM iniciaba la reacción. Las condiciones del ensayo fueron de agitación constante y a temperatura de 28°C.

Se verificó repetidamente que la reacción fuera específica para la oxidación de AIA mediante la titulación del AIA residual al final de la reacción por el reactivo de Salkowski, técnica que describen Hinman y Lang (1977) y también se calculó la relación estequiométrica del oxígeno consumido y el AIA degradado, encontrando que con ligeras desviaciones se corresponden en forma equimolar.

4.7. - FORMACION DE OXINDOLES.

De acuerdo a la técnica descrita por Pressey (1990), se valoró la formación de Oxindoles por el aumento de absorbancia a 247 nm. 250 μg de proteína cruda se agregaban a un medio de reacción que contenía en concentraciones finales: 3.5 mM de Citrato de Sodio, DCP 100 μM , MnCl_2 40 μM y AIA 200 μM ; con pH 4.2. La reacción se iniciaba por la adición de Peróxido de Hidrógeno a una concentración final de 6 μM . La reacción se monitoreaba durante dos minutos midiendo el aumento de absorbancia a 247 nm.

4.8. - EFECTO *in vitro* SOBRE PEROXIDASA PURIFICADA DE RABANO.

2 μg de Peroxidasa Purificada de Rabano Tipo II se agregaban a un volumen final de medio de reacción que contenía en concentraciones finales: 1 mM de Citrato de Sodio, DCP 200 μM , MnCl_2 80 μM y AIA 200 μM a pH 4.2. A los 0 y 6 minutos se realizaba un espectro de absorción de 220 a 300 nm. Según el caso, se agregó a concentración final: 6 μM de Peróxido de Hidrógeno, 150 μM de FG y 150 μM de AIB.

5.- RESULTADOS.

Los datos obtenidos son resultado de al menos 2 repeticiones del método descrito. Ninguna diferencia de importancia significativa se observó en las repeticiones, lo que indica la confiable reproducibilidad del fenómeno.

5.1.- PROMOCION RIZOGENICA.

La formación de raíces adventicias en las condiciones descritas reveló que la aplicación de AIB+FG tenía el mayor efecto rizogénico, con 201.59 % de formación de raíces laterales adicionales respecto al testigo con agua destilada. Los parámetros valorados se pueden observar en la cuadro 1 que representan la formación de raíces a los 4 y 8 días de tratamiento, respectivamente. Es interesante la débil respuesta que tiene la especie a la aplicación de AIA, sobre todo en el primer intervalo de cuantificación. El caso del FG muestra una estimulación del 22.99 % adicional al control, aunque es prudente mencionar que se comporta como un tratamiento inconsistente en su estímulo como lo denotan las desviaciones estándar de sus parámetros. Por su parte, el tratamiento con AIB a los 4 y 8 días mostró ser el más efectivo en promover por sí mismo la formación de raíces adventicias con el 96.43 % y 176.01 % respectivamente.

En cuanto a la velocidad de enraizamiento la tendencia varió ligeramente en el caso del lote tratado con AIA que, a los 4 días mostraba menos estimulación que el lote tratado con FG y a los 8 días este último tratamiento era superado sensiblemente. Por otra parte, el caso que sí se invirtió drásticamente fue el tratamiento de AIA+FG, que de 1.24% a los 4 días aumento a 61% de promoción rizogénica, mucho mayor al tratamiento con FG y con AIA aplicados independientemente.

Por su parte, las combinaciones de los tratamientos AIA+FG y AIB+FG mostraron un interesante comportamiento; mientras que el AIA+FG inducía la formación de raíces en magnitudes cercanas a las que

CUADRO No. 1 PROMOCION RIZOGENICA DE LOS TRATAMIENTOS APLICADOS A LOS
4 Y 8 DIAS

TRATAMIENTOS	4 DIAS		8 DIAS	
	No DE RAICES	% PROMOCION	No DE RAICES	% PROMOCION
CONTROL	MED 5.61		15.76	
	DS 3.74		6.45	
FG	MED 6.90	22.99	20.16	27.91
	DS 4.92		8.60	
AIA	MED 6.50	17.64	23.57	49.55
	DS 3.89		6.50	
AIB	MED 11.02	96.43	43.50	176.01
	DS 6.65		10.32	
AIA+FG	MED 5.68	1.24	25.41	61.23
	DS 3.39		12.33	
AIB+FG	MED 11.82	110.69	47.53	201.53
	DS 6.79		13.83	

Control= segmentos tratados con agua destilada; FG=Floroglucinol

100 μ M; AIA= Acido Indol Acetico 100 μ M; AIB= Acido Indol Butirico

100 μ M; AIA+FG= Acido Indol Acetico 100 μ M + Floroglucinol 100 μ M; AIB+FG

= Acido Indol Butirico 100 μ M + Floroglucinol 100 μ M.

promueven el AIA por sí solo, el tratamiento con AIB+FG parece ser sumatorio de la promoción dada por el FG y la inducida por AIB.

En particular, las características de las raíces formadas variaban de acuerdo al tratamiento empleado; el control formaba pocas raíces de apariencia vigorosa; el tratamiento con FG formaba más raíces que el control, de longitud más pronunciada y principalmente en la base de la estaca. Para el caso del AIA las raíces se caracterizaron por largas y vigorosas, mientras que los casos tratados con AIB formaban abundantes raíces y primordios de raíz de tamaño pequeño y diámetro reducido a lo largo de todo el tallo de la estaca.

5.2.- PATRONES ISOENZIMÁTICOS DE AIA-OXI.

El polimorfismo enzimático de la AIA-ox encontrado durante el presente trabajo indica una relación estrecha entre los fenómenos de formación de raíces y el patrón isoenzimático presente:

En primer lugar, se observan diferencias entre los geles de los extractos de raíz y tallo; mientras que en la raíz se distinguen dos bandas con Rfs de 0.085 (A) y 0.514 (D), en el tallo se revelan dos isoenzimas con Rfs de 0.142 (B) y 0.328 (C). En ambos casos se aprecia la existencia de una banda catiónica con Rf de 0.642 (E), como se nota en la figura 1.

Los patrones isoenzimáticos revelados para los lotes con 4 días de tratamiento se pueden observar en la figura 2, en donde se nota que en los casos de tratamientos con AIA, AIB y AIB+FG existen un mayor número de bandas y que precisamente corresponden a las bandas A y D encontradas en los extractos de raíz. En el extracto obtenido del tratamiento con AIA+FG la presencia de las dos bandas adicionales mencionadas se revela muy tenuemente. Los patrones isoenzimáticos revelados para los lotes con 8 días de tratamiento pueden observarse en la figura 3. En estos esquemas se puede ver que el patrón es muy similar entre los tratamientos, con la presencia de las bandas A, B, C, D, y E en los extractos de los lotes con AIA, AIB, AIA+FG y AIB+FG; los casos de C y FG muestran solamente las bandas B, C, y D.

FIGURA No.1 PATRONES ISOENZIMATICOS DE AIA-ox DE EXTRACTOS OBTENIDOS DE RAIZ Y TALLO DE FRIJOL MUNGO

21

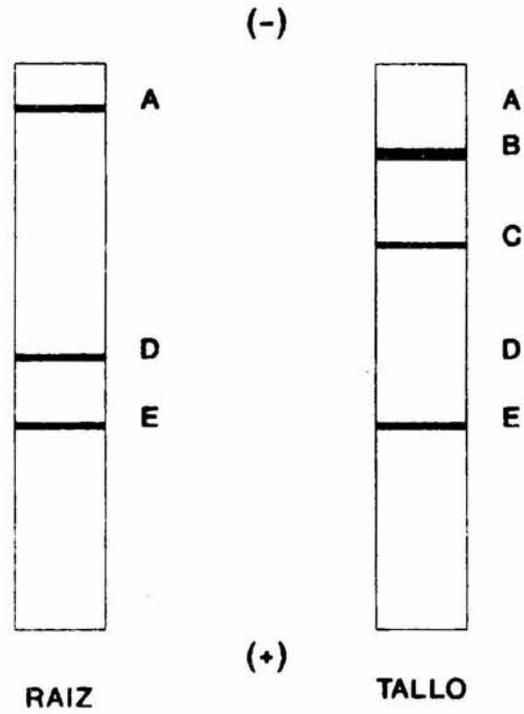


FIGURA No.2 PATRONES ISOENZIMATICOS DE AIA-ox DE EXTRACTOS OBTENIDOS DE LOS TRATAMIENTOS A LOS 4 DIAS

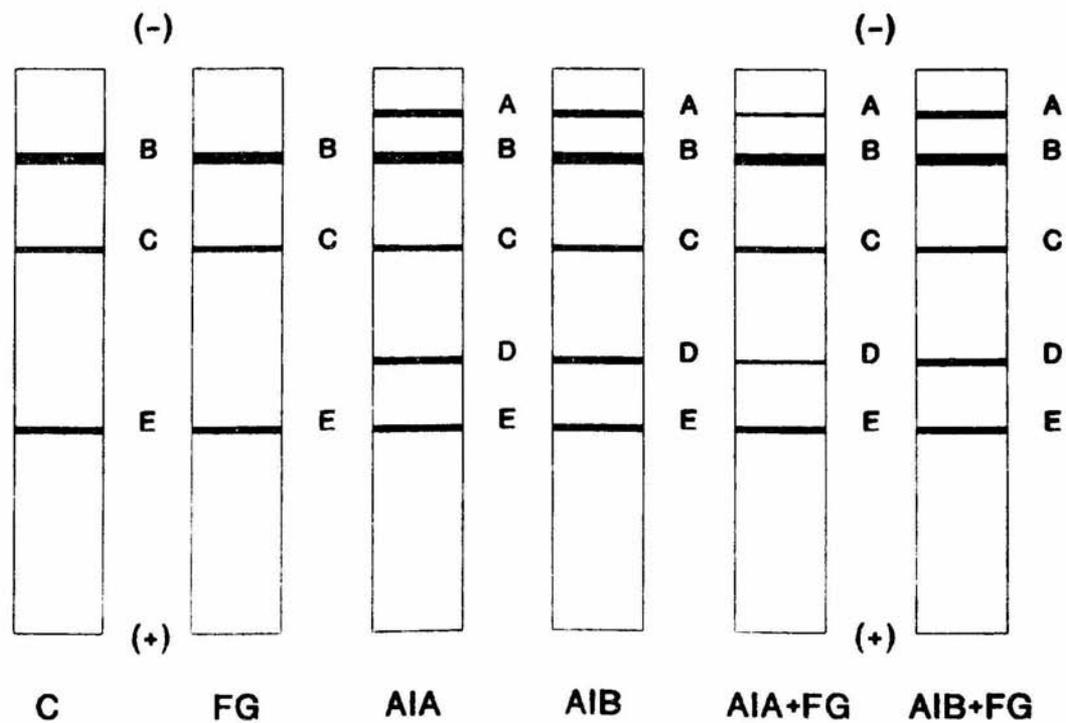
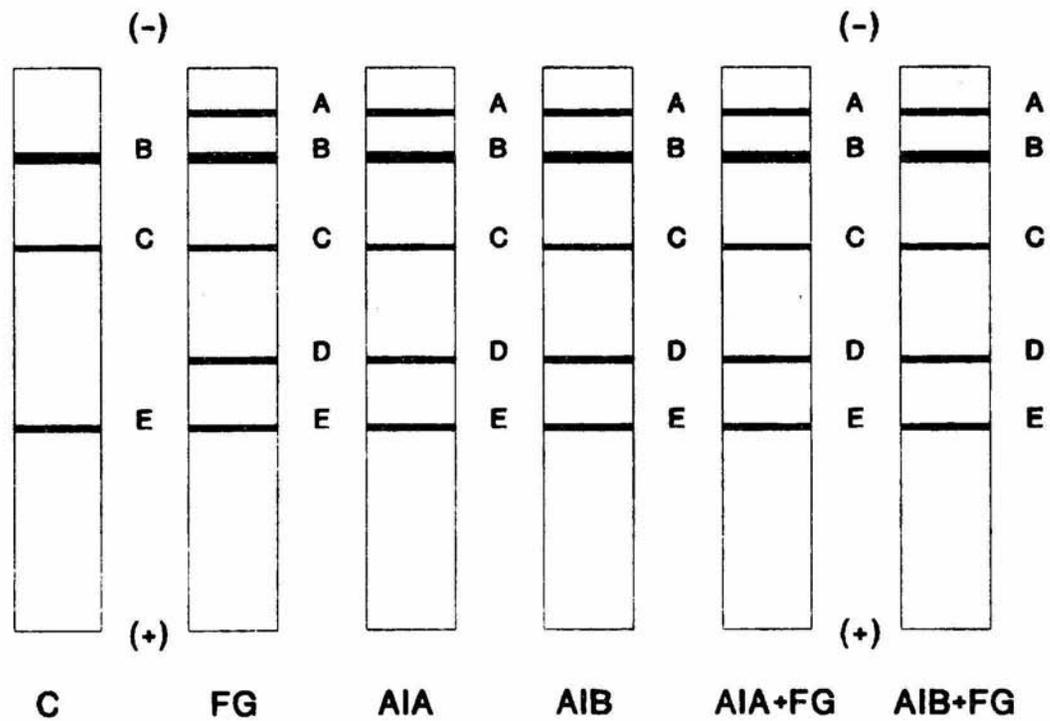


FIGURA No.3 PATRONES ISOENZIMATICOS DE AIA-ox DE EXTRACTOS OBTENIDOS DE LOS TRATAMIENTOS A LOS 8 DIAS



5.3. - ACTIVIDAD DE AIA-OXIDASA

5.3.1. - CONSUMO DE OXIGENO.

El consumo de oxígeno como criterio de actividad total de AIA-ox se observa en la cuadro 2 para el tiempo de 4 días; como se aprecia, la actividad máxima ocurre en el caso del tratamiento con AIB+FG, mientras que el testigo muestra la menor actividad. Los tratamientos con AIB y AIA+FG tienen prácticamente la misma actividad total de AIA-ox.

Para los 8 días de tratamiento los valores de actividad se pueden observar en el cuadro 3. En general la actividad aumenta en relación a la registrada a los 4 días, aunque el comportamiento respecto a los tratamientos difiere marcadamente. Es interesante que en este momento el extracto obtenido del tratamiento con AIB+FG es el que muestra la actividad más baja de AIA-ox, mientras que el tratamiento con AIB tiene la actividad más alta del grupo; hay que mencionar que para este momento los tres tratamientos que contenían FG evidenciaron actividades bajas de AIA-ox.

CUADRO 2 ACTIVIDAD DE AIA-ox MEDIDA POR CONSUMO DE OXIGENO DE LOS
EXTRACTOS OBTENIDOS DE LOS TRATAMIENTOS A LOS 4 DIAS

TRATAMIENTOS	ACTIVIDAD DE AIA-ox <i>nanomoles de O₂/mg de proteína/ minuto</i>
C	86.52 +, - 6.44
FG	102.81 +, - 11.29
AIA	137.20 +, - 3.80
AIB	144.78 +, - 17.94
AIA+FG	144.87 +, - 15.13
AIB+FG	189.25 +, - 13.09

CUADRO 3 ACTIVIDAD DE AIA-ox MEDIDA POR CONSUMO DE OXIGENO DE LOS
EXTRACTOS OBTENIDOS DE LOS TRATAMIENTOS A LOS 8 DIAS

TRATAMIENTOS	ACTIVIDAD DE AIA-ox <i>nanomoles de O₂/mg de proteína/ minuto</i>
C	422.08 +, - 29.20
FG	264.27 +, - 17.14
AIA	436.42 +, - 27.43
AIB	464.07 +, - 11.25
AIA+FG	284.75 +, - 8.01
AIB+FG	262.29 +, - 15.47

5.3.2. - FORMACION DE OXINDOLES.

De acuerdo con Basu (1972), el coeficiente de extinción del Metilen oxindol se encuentra alrededor de 248 nm y por lo que el incremento de absorbancia en ese rango se interpretó como actividad de formación de oxindoles. El cuadro 4 contiene los resultados de formación de oxindoles para todos los tratamientos, a los 4 y 8 días. En el primer intervalo de medición el tratamiento con AIB+FG tiene más unidades de actividad, mientras que el testigo es el más bajo. A los 8 días, el testigo presentó la mayor actividad de formación de oxindoles, mientras que el caso del AIA+FG el menor, respecto a los otros dos lotes tratados con FG. Hay que notar que al igual que el consumo de oxígeno, la actividad de formación de oxindoles en general aumenta a los 8 días en todos los tratamientos, excepto el lote de AIA+FG.

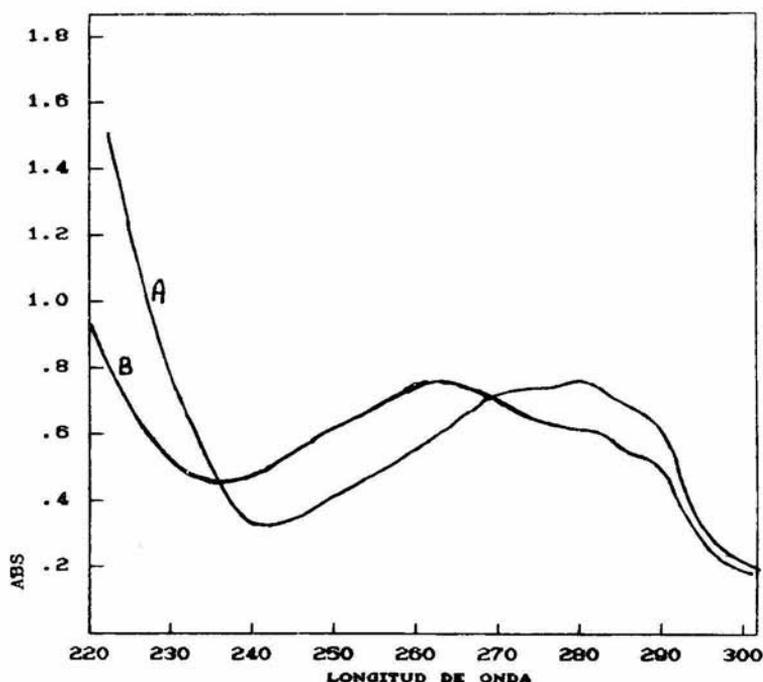
CUADRO 4 ACTIVIDAD DE FORMACION DE OXINDOLES DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DE LOS TRATAMIENTOS A LOS 4 Y 8 DIAS

TRATAMIENTOS	FORMACION DE OXINDOLES	
	4 DIAS	8 DIAS
C	5.26 +, - 0.75	13.04 +, - 2.83
FG	4.95 +, - 0.64	11.40 +, - 2.50
AIA	7.25 +, - 1.08	9.64 +, - 1.64
AIB	9.13 +, - 1.47	11.71 +, - 2.09
AIA+FG	10.11 +, - 2.03	8.30 +, - 1.71
AIB+FG	11.21 +, - 1.56	12.87 +, - 3.15

5.3.3.- EFECTO *in vitro* SOBRE PEROXIDASA DE RABANO.

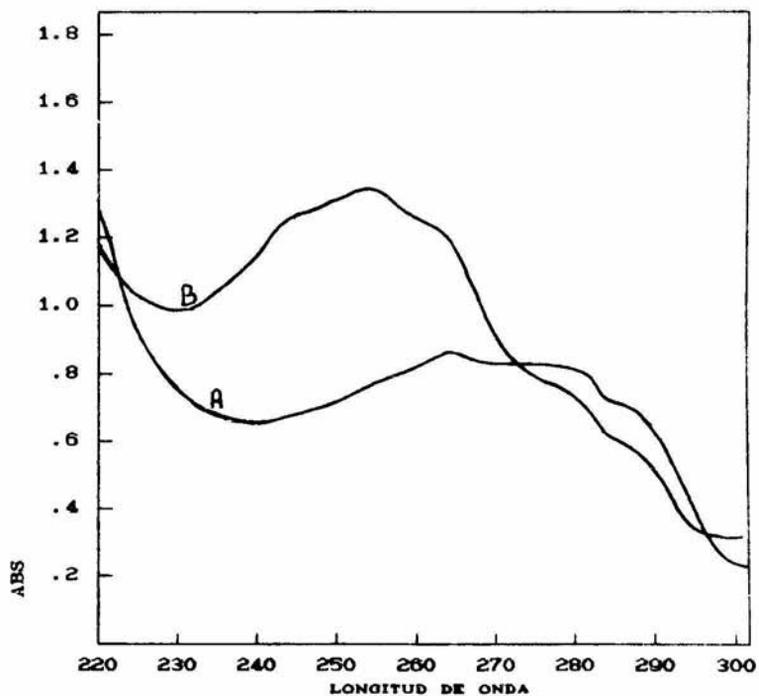
Los análisis espectrofotométricos de la actividad de AIA-ox de Peroxidasa purificada de Rábano tipo II realizados para observar la desaparición de los sustratos y la aparición de productos proporcionaron información acerca del efecto de las sustancias probadas.

GRAFICA 1 OXIDACION DEL AIA POR PEROXIDASA DE RABANO TIPO II
A=ESPECTRO AL TIEMPO 0; B=ESPECTRO AL TIEMPO 6 MINUTOS



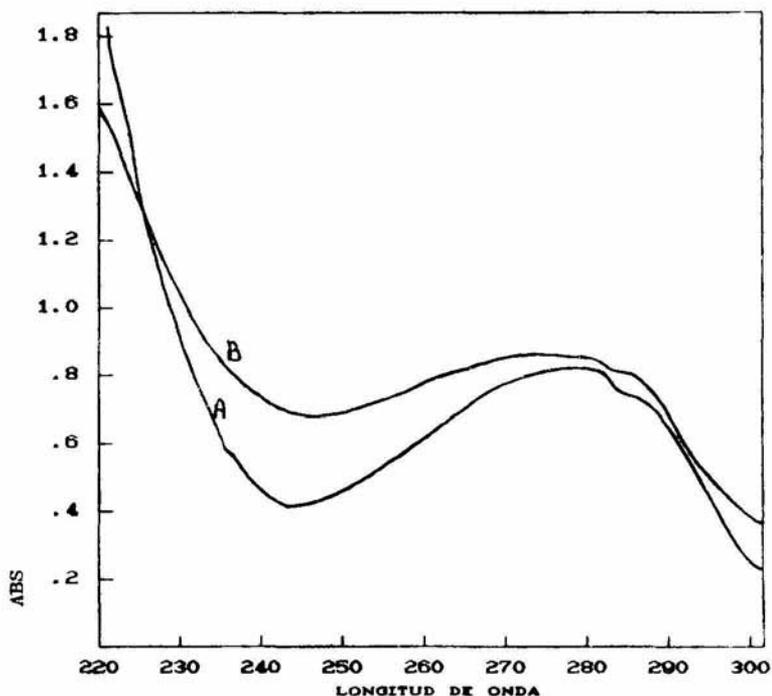
En la gráfica 1 se observa la oxidación del AIA a través de la disminución en los picos de 278 y 284, característicos del grupo indol y el aumento de absorbancia en el rango de 250-260 nm, donde el grupo oxindol tiene su mayor absorbancia.

GRAFICA 2 OXIDACION DEL AIA POR PEROXIDASA DE RABANO TIPO II
EN PRESENCIA DE $6 \mu\text{M}$ DE PEROXIDO DE HIDROGENO
A=ESPECTRO AL TIEMPO 0; B=ESPECTRO AL TIEMPO 6 MINUTOS



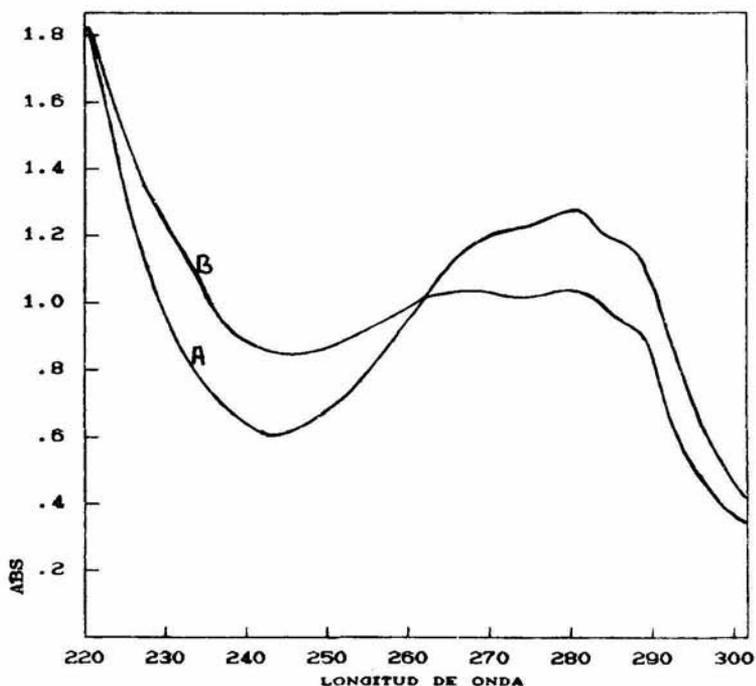
En la gráfica 2, la oxidación de AIA revela, en presencia de peróxido de hidrógeno un aumento muy importante en la formación de oxindoles y una disminución apreciable en los picos característicos del grupo indol.

GRAFICA 3 OXIDACION DEL AIA POR PEROXIDASA DE RABANO TIPO II
EN PRESENCIA DE 100 μM DE FG
A=ESPECTRO AL TIEMPO 0; B=ESPECTRO AL TIEMPO 6 MINUTOS



La presencia del FG evidentemente retrasa la formación de oxindoles, ya que la absorbancia a 278 y 284 no disminuye mucho y sobre todo a pesar de que sí se aprecia un aumento de absorbancia en el rango de 250-260 nm no se forma un pico como si sucede en ausencia de FG, esto se puede notar en la gráfica 3

GRAFICA 4 OXIDACION DEL AIA POR PEROXIDASA DE RABANO TIPO II
 EN PRESENCIA DE 100 μM DE AIB
 A=ESPECTRO AL TIEMPO 0; B=ESPECTRO AL TIEMPO 6 MINUTOS



El AIB tiene un efecto interesante en la reacción de oxidación del AIA; la absorbancia en el rango de los oxindoles aumenta sin formar pico y en 278 y 284 nm la absorbancia desciende marcadamente como se ve en la gráfica 4.

6.- DISCUSION.

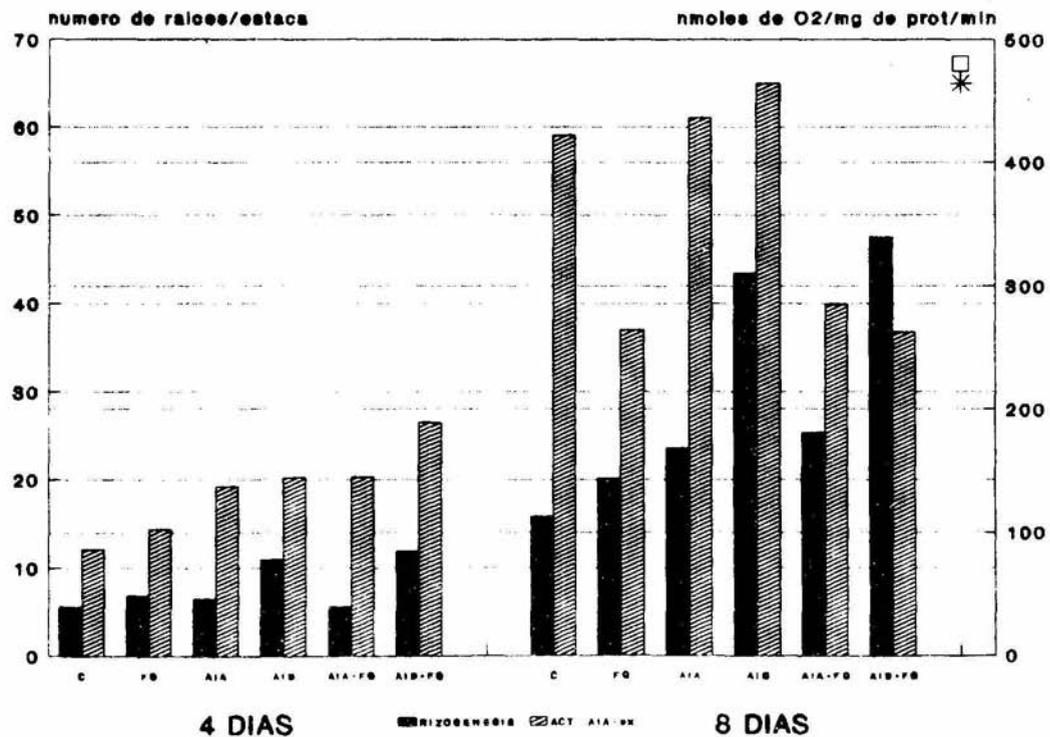
Los efectos, *in vivo* e *in vitro*, de los tratamientos aplicados a las estacas de *Phaseolus mungo* permiten una objetiva discusión acerca de la dinámica que sigue la actividad de AIA-ox durante la formación de raíces laterales.

El comportamiento observado en la promoción de raíces laterales merece menciones particulares; en primer lugar la débil respuesta que el AIA provoca en la rizogénesis es un aspecto que previamente ya ha sido discutido por Hess, Ch.(1961); sin tener argumentos para probarlo esta respuesta podría atribuirse a la obscuridad permanente durante el ensayo. Existen referencias que indican los efectos estimulantes de la luz en la formación de raíces, efecto mediado por la posible síntesis de fotosintatos, Jarvis y Ali (1990), que para el caso de *Phaseolus mungo* sería un aspecto interesante para estudiar.

Probablemente el tratamiento exógeno con AIA no permite el acceso de esta auxina a los sistemas de traslocación específicos de estas hormonas, de tal manera que interactúen con las células blanco. Jarvis y Shaheed (1986) encontro que la aplicación exógena basal de AIB es más efectiva para promover la traslocación basipétala del AIA que se aplica en hojas, probablemente este movimiento ocurre en un sistema que permite libre acceso al tejido blanco.

En general, se observa que al intervalo de 4 días, la actividad de AIA-ox es mayor en los tratamientos donde la promoción rizogénica también es mayor. Como se puede observar en la gráfica 5, para el tratamiento AIB+FG que promueve más rizogénesis que los demás tratamientos corresponde también la actividad AIA-ox más alta del grupo, la excepción de esta tendencia es el tratamiento AIA+FG el cual con una promoción semejante al control, muestra una actividad de AIA-ox mayor. En la misma gráfica 5 se puede observar que al intervalo de los 8 días en general la rizogénesis y la actividad de AIA-ox aumentan, sin embargo a diferencia de los 4 días al parecer los tratamientos C,AIA,AIB presentan magnitudes semejantes mientras que en

GRAFICA No.5 RELACION DE LA RIZOGENESIS Y LA ACTIVIDAD DE AIA-ox A 4 Y 8 DIAS



los tres casos de presencia de FG la actividad es baja, sin observarse un patrón que relacione número de raíces con actividad de AIA-ox. De este esquema se puede interpretar que no presentan un nivel de actividad máximo límite aunque la presencia de FG en los tratamientos representa un factor que interfiere para que se alcance el valor límite máximo de actividad.

El aumento absoluto de la actividad de 4 a los 8 días se podría entender en función de que existe mayor tejido radicular en el segundo intervalo de medición, si bien la actividad esta reportada en magnitudes específicas, la presencia de isoenzimas con mayor actividad de AIA-ox presentes en la raíz son la explicación a este resultado. Como se observa en la figura 1, en la raíz se encuentra un patrón diferente al del tallo. El polimorfismo enzimático es un fenómeno frecuente y ha sido documentado ampliamente incluyendo a las Pxs, Scandalios(1974). Los patrones isoenzimáticos a los 4 días indican que en los tratamientos con mayor cantidad de raíces, se notaba la presencia de isoenzimas que estaban en el tallo y en la raíz es decir, los cambios en los patrones se deben a la presencia de mayor cantidad de tejido radicular que determina esas bandas adicionales. En este punto se debe mencionar que en resultados que no se muestran se hicieron extractos de raíz y tallo por separado encontrándose que la actividad de AIA-ox en la raíz es mayor que la valorada para el extracto del tallo, lo cual contrasta con el reporte de Goldberg, R. *et al* (1986), donde se encuentra una reducción en la actividad de AIA-ox en dirección basipetalica. Los resultados de actividad de AIA-ox para raíz y tallo que se valoraron para la misma especie en este trabajo, indican una variación en la actividad en sentido inverso.

Las diferencias de isoAIA-ox presentes en la raíz y tallo, se pueden entender como expresiones génicas específicas del lugar anatómico que ocupan estas enzimas. Como se comenta al principio, se sabe que casi todas las AIA-ox son peroxidases y las bandas diferentes pueden estar relacionadas con otros procesos que también son propios de las Pxs como la lignificación (Huystec, 1987) y la producción de etileno, que también es un compuesto íntimamente relacionado con la formación de raíces (Feldaman, L. 1984).

De los registros espectrofotométricos obtenidos, y suponiendo una relación proporcional de la absorbancia a 248 nm a la presencia de oxindoles, se presume como se mencionó al principio, de las dos vías alternativas para la oxidación del AIA (Grambow y Schwich, 1983), los tratamientos causan operación de una ruta metabólica, como se observa en el cuadro 4, las mayores actividades de formación de oxindoles corresponden a las promociones rizogénicas más altas, sin embargo no se reproduce lo mismo en el caso de los 8 días, donde el testigo tiene la actividad más alta, Como lo discuten Grambow y Schwich (1983). En la vía de oxidación del AIA, la presencia de Peróxido de hidrógeno favorece que se produzcan derivados oxindólicos, mientras que su ausencia orienta hacia la formación de productos oxidados no oxindólicos; por su parte, los fenoles compiten con los derivados intermediarios del AIA por el peróxido de hidrógeno formado durante su oxidación-descarboxilación, por tanto, la presencia de fenoles, disminuiría la actividad de formación de oxindoles, ocurriendo como resultado una disminución de la relación de más raíces-más actividad enzimática, relación que si ocurre en la cuantificación al intervalo de los 4 días, este efecto se hace más evidente si se observa el cuadro 4 donde se ve que en los casos de presencia de FG se observan las actividades totales más bajas de AIA-ox.

Una explicación razonable de la disminución de la absorbancia en la región entre los 250 y 260 nm en los ensayos realizados en presencia de FG con Peroxidasa de Rábano es la desviación de la vía metabólica del AIA hacia la formación de Indol Aldehído o Indol Metanol provocada por la presencia de un fenol como el FG como reportan Grambow y Schwich (1983). En la gráfica 1 se nota que aún en ausencia de peróxido de hidrógeno la reacción conduce a la formación de oxindoles, dado el incremento en la absorbancia entre los 250 y 260 nm. Debe suponerse que la reacción podría generar peróxido de hidrógeno mientras el AIA se oxida, con la consecuente formación de oxindoles, si bien el nivel de este tipo de producto es inferior al obtenido cuando se adiciona peróxido. Este mismo proceso se identifica en la gráfica 2 aunque muy pronunciado por la presencia de trazas de peróxido desde el principio de la reacción; en tanto que en presencia de FG como lo indica la

gráfica 3, la aparición del pico característico de oxindoles no se produce, aunque sí hay un leve aumento de absorbancia en el rango de 250 a 260 nm. Evidentemente, en este caso, la oxidación está desviada hacia la vía indólica, con una aparente disminución en la velocidad.

En cuanto a la interesante disminución de los picos del indol en la mezcla de AIA+AIB como se nota en la gráfica 4, sin la formación de un pico de oxindoles, se podría discutir que existe un metabolismo paralelo del AIA y el AIB. Probablemente el AIB compite por el peróxido formado por la oxidación del AIA y por eso los oxindoles no se forman, o bien, el mismo AIA sirve como catalizador de la oxidación del AIB al mismo tiempo que los productos derivados del AIB no son oxindoles. Este aspecto del metabolismo del AIB requiere más estudios.

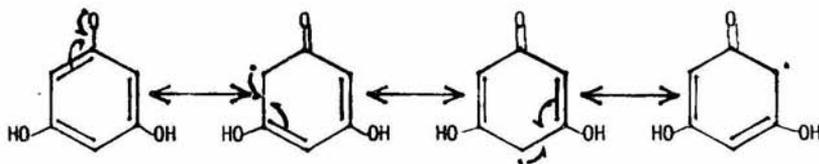
Si bien Riov y Epstein (1988) reportan que el AIB es oxidado por estacas de frijol mungo, no se han caracterizado ampliamente las rutas de degradación que sigue. Con base en datos que no se muestran se ha observado, que el AIB al ser incubado en presencia de peroxidasa de rabano, consume oxígeno en un proceso que es fuertemente dependiente de peróxido de hidrógeno.

En un intento de integración de los diversos resultados y con la intención de formular un mecanismo que describa el fenómeno observado se puede decir que si se supone un nivel infraóptimo de Metilen-oxindol(o algún producto de la oxidación del AIA) y en los primeros 4 días se forma más como resultado de una mayor actividad de AIA-ox, se pueden tener niveles supraóptimos como los con que la respuesta se reduce, porque se vuelven tóxicos, pero como explicar que que aun bajando esta actividad, AIA+FG con respecto a AIB, el número de raíces es similar. Se desconoce sin embargo que si el consumo de oxígeno se debe a la formación de oxindoles u otros productos de oxidación. Lo que si se observa es que el FG determina una reducción de la actividad de AIA-ox y que el AIB promueve mayor número de raíces, halla o no FG. Esto sugiere una ausencia de una relación estrecha entre AIA-ox y rizogénesis, una estrecha correlación entre AIB y rizogénesis y es de resaltarse también la baja correlación entre el tratamiento con AIA y la rizogénesis.

La evidencia de una tendencia de relación de mayor actividad AIA-ox con mayor número de raíces a los 4 días no se debe aparentemente a que la Peroxidasa active al agente iniciador del proceso, más bien, parece ser una consecuencia de este o de un mecanismo para controlarlo. La aparición de más raíces con una mayor actividad de AIA-ox reduce los niveles de AIA y evita que continúe el proceso rizogénico.

En cuanto a la presencia de FG aplicado exógenamente se puede suponer que existen dos fenómenos involucrados. En primer lugar la aplicación exógena de FG disminuye la formación de oxindoles por tanto la actividad de AIA ox es más lenta y aunque no existe un aporte externo de auxinas, la misma planta lo sintetiza en sus meristemas apicales, por lo tanto en esa primera fase, la formación de raíces no es tan numerosa, sin embargo el aletargamiento en su oxidación da lugar a una segunda fase de persistencia del AIA que si bien una de sus funciones es la inducción de raíces, otra es la elongación celular y precisamente las raíces formadas en presencia de FG tienen esa característica de longitud; es decir el FG podría efectuar su sinergismo retardando la oxidación del AIA y permitiendo su acumulación para un segundo periodo de elongación. El mecanismo químico que podría explicar la disminución de actividad de AIA-ox provocada por el FG se puede encontrar en un posible efecto antioxidante del FG; es decir, la oxidación de AIA si bien es un proceso enzimático, implica al mismo tiempo la formación de radicales libres, que son intermediarios en la ruta, la simple presencia de peróxido de hidrógeno en el proceso hace sospechar esa situación. Entonces el FG puede funcionar como un antioxidante al captar los radicales libres formados por la disociación de peróxido de hidrógeno y por tanto interrumpir la secuencia de reacciones; él puede funcionar como antioxidante ya que posee una estructura química apropiada para eso, sus tres sustituyentes hidroxilo en posición meta recíprocamente son una combinación ideal para captar al radical peróxido y estabilizarse así mismo por la alternante reorganización a su forma cetónica y posterior resonancia. Una forma esquematizada de este efecto antioxidante se puede observar en el esquema 2. Esta proposición concuerda bien con el espectro de la oxidación del AIA en presencia de FG (gráfica 3), donde no se da la formación del pico característico.

de oxindoles y puede ser precisamente porque los radicales del peróxido que activan la vía oxindólica están siendo captados por el FG.



ESQUEMA No 2. REPRESENTACIÓN DE LA CAPTACIÓN DE PEROXIDO POR FG, REORGANIZACIÓN A FORMA CETONICA Y ESTABILIZACIÓN POR ESTRUCTURAS RESONANTES.

En relación a la oxidación del AIB, se puede involucrar un efecto adicional de los derivados de su degradación que como se mencionó no son oxindoles y no requieren oxígeno para su formación, en este caso se precisa un análisis adicional de sus derivados, ya que en principio su aplicación exógena estimula tanto la actividad de AIA-ox como la formación de raíces, sin embargo es probable que no se de su efecto precisamente a este nivel de la enzima como lo demuestra la grafica 5, sino más bien tratar de relacionar su efecto con posibles alternativas como la estimulación de la traslocación de auxinas endógenas, o en relación a los gradientes iónicos que involucren al Calcio Como lo describe Jarvis y Yasmin (1985).

Finalmente se puede agregar que de las relaciones establecidas entre la formación de raíces y la actividad de la AIA-ox, se puede decir que a los 4 días del corte existe una relación aparente de la actividad de AIA-ox y la cantidad de raíces formadas y para los 8 días no se puede establecer ningún patrón que relacione dichas variables, más bien en este momento los niveles de actividad son semejantes independientemente del número de raíces y del tratamiento, excepto para los casos en los cuales esta presente el FG donde la actividad es apreciablemente menor. Por tanto, si es que existe una relación entre esas dos variables dicha relación debe seguir una dinámica que involucre más elementos de los valorados como: una distinción entre las funciones de la actividad de la AIA-ox para un efecto de inducción de rizogénesis o un efecto de elongación; por otra parte consideraciones adicionales sobre los estados del desarrollo de la planta y de los tejidos radicales en si mismos en intervalos que consideren variaciones en el orden de horas sobre la regeneración del sistema radicular y finalmente experimentos adicionales que tengan mejor resolución sobre la dirección que sigue el metabolismo del AIA en sus dos posibles vías de oxidación que se reconocen hasta el momento.

Con los resultados obtenidos en este trabajo no se puede establecer sin restricciones la relación directa de la actividad de la AIA-ox con la formación de raíces laterales sin embargo no se considera concluyente la exclusión de dichas variables, más bien indican que

como debería de esperarse, la relación se establece en los primeros momentos; a los 4 días o antes, que es cuando precisamente se da la diferenciación hacia raíces, en ese sentido se considera importante la oxidación de AIA y por tanto; es un argumento que se suma a los numerosos escritos que reconocen un legítimo significado fisiológico de la oxidación del AIA. Sondheimer y Griffin (1960), Huytec (1987) y muy recientemente Pressey (1990) discuten con mucha objetividad y con poca visión integradora los elementos que contrastarían la relación descrita arriba. Sin embargo un fenómeno que correlaciona dichas variables en forma importante, no puede ser resultado de una casualidad artificial. La abrumadora cantidad de información que se ha publicado en ese sentido así lo indica y el presente trabajo es una modesta contribución a tan formidable labor de convencimiento.

7.- CONCLUSIONES.

Resumiendo los resultados del presente trabajo, se puede decir lo siguiente:

- De los tratamientos aplicados, la combinación AIB+FG muestra el mayor efecto promotor de formación de raíces adventicias.
- Existe diferente polimorfismo enzimático de AIA-ox en los extractos de raíz y tallo.
- Las diferencias de patrones de AIA-ox entre los tratamientos se atribuyen a la suma de los patrones de la raíz y el tallo.
- A los 4 días del corte se corresponden en general un mayor número de raíces con una mayor actividad de AIA-ox, mientras que a los 8 días los niveles de actividad de AIA-ox son semejantes independientemente del número de raíces; excepto en los casos donde el tratamiento incluyó FG, donde la actividad fue menor.
- El FG en el tratamiento provoca disminución en la actividad total de AIA-ox, pero no impide la formación de oxindoles cuando las raíces ya están formadas.
- El FG inhibe la formación de oxindoles en la reacción de AIA-ox de Peroxidasa Purificada de Rábano Tipo II.
- El AIB se degrada en un proceso que no forma oxindoles y que es fuertemente dependiente de peróxido de hidrógeno y oxígeno.

8.- REFERENCIAS

- Bansal,M;Nanda,K.(1981).IAA oxidase activity in relation to adventitious root formation on stem cuttings of some forest tree species.*Experientia*.37:1273-1274.
- Basu,P;Tuli,V.(1972).Auxin activity of 3-Metileneoxindole in wheat.*Plant. Physiol.* 50:499-502.
- Bradford,M.(1976).A rapid and sensitive method for the cuantitation of micro quantities of protein.*Ann. Biochem.* 72:248.
- Chibbar,R;Gurumurti,K;Nanda.K.(1979).Changes in IAA oxidase activity in rooting hypocotyl of *Phaseolus mungo* L.*Experientia*. 35:202-203.
- Davies,B.(1964).Disc electrophoresis.II.Methods and aplication to human serum proteins.*Ann. N. Y. Acad Sci.*121:404-427.
- Demorest.D;Stahmann,M.(1972).The binding of peroxidase oxidation products of Indole-3-acetic acid to histone.*Bioche and Biophy Res Comm* 47:227-233.
- Driss,D;Perbal,G.(1987).Intracelular localization of H³-IAA in the apical bud of *Lycopersicon esculentum*.*J Exp Bot.*38:1362-1372.
- Evans,M.(1984).Functions of hormones at the cellular level of organization.II.The Functions of hormones from the level of the cell to the wole plant.Ed.T.K. Scott.New Series Vol.10.pp.23-79.
- Fald ,M;Hartmann.H.(1967).Isolation,purification and characterization of an endogenous root-promoting factor obtained from basal sections of pear hardwood cuttings.*Plant Physiol.* 12:541-549.
- Feldman,L. (1984). Regulation of root developmpent. *Ann Rev Plant Physiol.*35:223-242.

- Goldberg,R;Imberty,A;Chu-Ba,J.(1986).Development of isoperoxidases along the growth gradient in the mung bean hypocoryl.*Phytochemistry*. 25:1271-1274.
- Grambow,H;Schwich,L.(1983).The relationship between oxidase activity,peroxidase activity,hydrogen peroxide and phenolic compounds in the degradation of IAA.*Planta*.157:131-137.
- Grison,R;Pilet,P.(1985).Maize root peroxidase:Relationship with polyphenol oxidases.*Phytochemistry*. 24:2519-2521.
- Hames,B.(1981).An introduction to polyacrylamide gel eletrophoresis.*En Gel electrophoresis of protein:A practical approach.*ed Hames,B.IRL Press limited.Engalnd.pp.1-86.
- Hess,Ch.(1961).The mung bean bioassay for detection of root promoting substances.*Plant Physiol*. 36:XXI.
- Hirman,R.Lang,J.(1965).Peroxidase-catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid.*Biochemistry*. 4:144-158.
- Huystec,R.(1987).Some molecular aspects of plant peroxidases.Biosintetic studies.*Ann Rev Plant Physiol*. 37:509-538.
- Jarvis,B; Ali,A. (1985) The influence of irradiance on the root regeneration in stem cuttings of mung bean. *New Phytol*. 101:233-239.
- Jarvis,B; Shaheed,A.(1986).Adventitious root formation in relation to the uptake and distribution of supplied auxin. *New Phytol*.103:23-31.
- Jarvis,B; Yasmin, S.(1985) The influence of calcium on adventitious root development in mung bean cuttings. *Biochem Physiol Pflanzen*. 180: 697-701.
- Jones,O.(1976).Effect of phloridzin and phloroglucionol on apple shoots.*Nature* 262:392-393.

- Kefeli, V. (1978). *Natural plant growth inhibitors and phytohormones*. Dr W. Junk bv Publishers. Boston. pp. 277.
- Kokinakis, D; Broocks, L. (1979) Hydrogen peroxide-mediated oxidation of Indole-3-Acetic acid by tomato peroxidase and molecular oxygen. *Plant Physiol.* 64:220-223.
- Larke, A; Reyes, R. (1988). El uso de las hormonas vegetales en la agricultura mexicana. *Ciencia y Desarrollo*. 54:49-63.
- Lee, T; Rock, G; Stoessl, A. (1978). Effects of orcinol and related phenantrenes on the enzymic degradation of Indole 3 acetic acid. *Phytochemistry*. 17:1721-1726.
- Lee, T; Starrat, A; Jevnikar, J. (1982). Regulation of enzymic oxidation of indole-3-acetic acid by phenols: Structure-activity relationships. *Phytochemistry*. 21:517-523.
- Mata, B. (1987). La producción de alimentos en México. UAM-Xochimilco. México. pp. 243.
- Milrad, S; Tigier, H. (1983). Effect of some dicarboxylic acids on the peroxidase-IAA oxidase isozymes of soybean callus. *Plenet Plant* 59: 355-358.
- Mollan, R. et al (1972) *Phytochemistry*. 11:1485-1488.
- Pluss, R; Jenny, T; Meier, H. (1989). IAA-induced adventitious root formation in greenwood cuttings of *Populus tremula* and formation of 2-indolone-3 acetylaspatic acid, a new metabolite of exogenously applied indole-3-acetic acid. *Physiol Plant*. 75:89-96.
- Pressey, R. (1990). Anions activate the oxidation of indole acetic by peroxidases from tomato and other sources. *Plant Physiol*. 93:798-804.
- Reinecke, D; Bandurski, R. (1988). Oxidation of Indole-3-acetic acid to Oxindole-3-acetic acid an enzyme preparation from *Zea mays*. *Plant*

Physiol. 86:868-872.

Riov,J;Epstein,E.(1988).Comparison of movement and metabolism of Indole-3-acetic acid and Indole-3-butiric acid in mung bean cuttings.*Physiol Plant.* 74:556-560.

Rojas,M;Ramirez,H.(1987).Control hormonal del desarrollo de las plantas.Limusa.Mexico.pp.239.

Scandalios,J.(1974). Isozymes in development and diferentiation. *Ann Rev Plant Physiol.* 25:255-258.

Schneider,E.Kazakoff,C; Wightman,F .(1985). Gas chromatography-mass spectrometry evidence for several auxins in pea seedling organs.*Planta* 165:232-241.

Sembder,G;Gross,D.Scheneider,G.(1980).Biosintesis and metabolism of plant hormones.en Springer,V.ed.Hormonal regulation of development I.Encyclopedia of plant physiology.New Series Vol.9.New York.280-384.

Sergeeva,L;Aksenova,N;Konstantynova,T.(1985).In vivo and in vitro studies of peroxidases and IAA-oxidases activity in relation to floral morfogenesis in "Tobaco".*Biologia Plantarum.* 27:330-333.

Sondheimer,E.(1960).Activation of Indole acetic oxidase activity from peas.*Science.* 131:672.

Stalarec,W. et al (1990) The dose response curves for IAA induced elongantion growt and acidification of the medium of *Zea mays* coleoptiles segments. *Physiol Plant.* 80:257-2F1.

Talwar,G;Densay,J;Gupta,V.(1985).Kinetic properties from mung bean cotiledons.*Phytochemistry.* 24:673-676.

Theologist,A.(1986).A rapid gene regulation by auxin.*Ann Rev Plant Physiol.* 37:407-438.

Thimann,K.(1974).Fifty years of plant hormone research.*Plant Physiol.* 54:450-453.

Valpuesta,V;Buckovac,M.(1983).Cherry fruit development:Indole acetic acid oxidase isozymes in the seed.*Physiol Plant.* 58:209-213.

Wain,R;Taylor,H.(1965).Phenols as a plant growth regulators.*Nature.* 207: 167-169.

Wareing,P;Phillips,I.(1978)^{2a}.The control of the growth & differentiation in plants.Pergamon Press.London.pp.347.